



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Πτυχιακή Εργασία

“Ευαισθησία απομονώσεων του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary από κολοκυνθοειδή, που συλλέχθηκαν κατά το έτος 2018, σε διάφορες ομάδες μυκητοκτόνων ”



ΛΥΔΑΚΗ ΜΑΡΙΑ – ΑΝΤΩΝΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής : Βέλλιος Ευάγγελος

ΒΟΛΟΣ 2019

“Ευαισθησία απομονώσεων του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary από κολοκυνθοειδή, που συλλέχθηκαν κατά το έτος 2018, σε διάφορες ομάδες μυκητοκτόνων ”

“Fungicide sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary isolates, collected from cucurbits during 2018”

Ευάγγελος Βέλλιος (Επιβλέπων Καθηγητής)
Επίκουρος Καθηγητής, Φυτοπαθολογία-Σύγχρονες Μέθοδοι Διαγνωστικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Τσιρόπουλος (Μέλος)
Καθηγητής, Χημεία, Ανάλυση και Προσδιορισμός Οργανικών Ουσιών Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Dr. Φεβρωνία Λιολιοπούλου,(Μέλος)
Μέλος ΕΔΙΠ

Στην οικογένειά μου...

«Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του ΤΓΦΠΑΠ»



Λυδάκη Μαρία - Αντωνία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	VI
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	VIII
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Ασθένειες προκαλούμενες από τον μύκητα <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ...2	
1.2 Συμπτώματα και σημεία.....	2
1.2.1 Το παθογόνο.....	4
1.3 Μέθοδοι Αντιμετώπισης της ασθένειας.....	6
1.3.1 Χημική Καταπολέμηση.....	7
1.3.1.1 Azoxystrobin.....	7
1.3.1.2 Chlorothalonil	8
1.3.1.3 Cyprodinil.....	9
1.3.1.4 Fluazinam.....	10
1.3.1.5 Penconazole.....	11
1.4 Βιολογική αντιμετώπιση.....	11
1.5 Σκοπός Διατριβής.....	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
2.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων.....	14
2.2 Ανάπτυξη καθαρής καλλιέργειας <i>S. sclerotiorum</i> από σκληρώτιο.....	15
2.3 Αποτελεσματικότητα μυκητοκτόνων στην αναστολή ανάπτυξης μυκηλίου και παραγωγής σκληρωτίων του μύκητα <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	17
2.3.1. Εκτίμηση αποτελεσματικότητας.....	19
2.4. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	19

2.4.1. Υπολογισμός ποσοστού αναστολής ανάπτυξης επιφάνειας μυκηλίου..19	
2.4.2 Υπολογισμός αποτελεσματικής συγκέντρωσης EC50.....19	
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....20	
3.1. Αποτελεσματικότητα δραστικών ουσιών.....21	
3.1.1. Azoxystrobin.....21	
3.1.2. Chlorothalonil.....22	
3.1.3. Cyprodinil.....24	
3.1.4. Fluazinam25	
3.1.5. Penconazole.....27	
3.2. Αριθμός και Βάρος σκληρωτίων ανά μυκητοκτόνο.....28	
3.3. Συγκριτική απεικόνιση αποτελεσματικότητας azoxystrobin, azoxystrobin + 100 ppm SHAM και SHAM30	
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....32	
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....38	
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....40	

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Λευκό μυκήλιο και διακριτά μαύρα σκληρώτια σε κεφαλή λάχανου με προχωρημένη σήψη από την περιοχή του Αγ. Γεωργίου Βέροιας

Εικόνα 2: Ανάπτυξη λευκού βαμβακώδους μυκηλίου σε αποθηκευμένα καρότα σε εταιρία παραγωγής λαχανικών στην Ελβετία

Εικόνα 3: Συντακτικός χημικός τύπος του μορίου της δραστικής ουσίας azoxystrobin

Εικόνα 4: Συντακτικός χημικός τύπος του μορίου της δραστικής ουσίας chlorothalonil

Εικόνα 5: Συντακτικός χημικός τύπος του μορίου της δραστικής ουσίας cyprodinil

Εικόνα 6: Συντακτικός χημικός τύπος του μορίου της δραστικής ουσίας fluazinam

Εικόνα 7: Συντακτικός χημικός τύπος του μορίου της δραστικής ουσίας penconazole

Εικόνα 8: Βλαστός αγγουριάς με εμφανές λευκό μυκήλιο και μαύρα ευμεγέθη σκληρώτια εντός και εκτός των ιστών

Εικόνα 9: Καρπός κολοκυθιάς με εμφανή υγρή σήψη και μαύρα ευμεγέθη σκληρώτια στην επιφάνειά του

Εικόνα 10: Περιοχές όπου πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία από προσβεβλημένες καλλιέργειες. Περιοχή Α: Πυργετός, Ν. Λάρισας, Περιοχή Β: Αϊδίνιο, Ν. Μαγνησίας

Εικόνα 11: Σκληρώτια του μύκητα *S. sclerotiorum* μετά τη συλλογή από προσβεβλημένους ιστούς

Εικόνα 12: Ανάπτυξη μυκηλίου *S. sclerotiorum* σε τριβλία τύπου Petri 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PGA, 100ppm SHAM και 0(αριστερά), 0,1(κέντρο), 1(δεξιά) ppm azoxystrobin

Εικόνα 13: Ανάπτυξη μυκηλίου *S. sclerotiorum* σε τριβλία τύπου Petri 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PGA και 0(αριστερά), 10(δεξιά) ppm chlorothalonil

Εικόνα 14: Ανάπτυξη μυκηλίου *S. sclerotiorum* σε τριβλία τύπου Petri 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PGA και 0(αριστερά), 10(δεξιά) ppm cyprodinil

Εικόνα 15: Ανάπτυξη μυκηλίου *S. sclerotiorum* σε τριβλία τύπου Petri 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PGA και 0(αριστερά), 0,1 (δεξιά) ppm fluazinam

Εικόνα 16: Ανάπτυξη μυκηλίου *S. sclerotiorum* σε τριβλία τύπου Petri 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PGA και 0(αριστερά), 1(κέντρο), 10(δεξιά) ppm penconazole

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση 5 δραστικών ουσιών, από διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων, ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην αντιμετώπιση του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*, ο οποίος προκαλεί εκτεταμένες ζημιές σε ποικίλες καλλιέργειες λαχανοκομικών (υπαίθριων και θερμοκηπίου). Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε τους μήνες Μάιο και Δεκέμβριο του 2018 από περιοχές των νομών Μαγνησίας και Λάρισας. Οι απομονώσεις προέκυψαν έπειτα από βλάστηση σκληρωτίων, τα οποία είχαν απολυμανθεί μετά τη συλλογή τους από τα προσβεβλημένα δείγματα. Η αποτελεσματικότητα των δραστικών ουσιών azoxystrobin, chlorothalonil, cyprodinil, fluazinam και penconazole, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0 – 0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 -10 ppm) ελέγχθηκε ως προς την αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου και για μία απομόνωση και ως προς την αναστολή δημιουργίας σκληρωτίων. Ο έλεγχος της ευαισθησίας των απομονώσεων πραγματοποιήθηκε *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα PGA, το οποίο είχε εμπλουτιστεί με τις διάφορες συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν πως η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για τα penconazole, azoxystrobin και fluazinam ήταν 10, 1 και 0,1 ppm αντίστοιχα. Για το chlorothalonil και το cyprodinil η MIC ήταν μεγαλύτερη από 10 ppm, η οποία ήταν η μέγιστη συγκέντρωση δραστικών ουσιών που δοκιμάστηκε. Η μέση αποτελεσματική συγκέντρωση EC50 για το chlorothalonil ήταν 0,334ppm, για cyprodinil 0,096 ppm, για το penconazole 0,427 ppm, ενώ για το fluazinam και το azoxystrobin παρουσία 100 ppm SHAM ήταν μικρότερη από 0,001 ppm.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ασθένειες προκαλούμενες από τον μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*

Ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* είναι ένας ευρέως εξαπλωμένος φυτοπαθογόνος μύκητας με μεγάλο κύκλο ξενιστών (πάνω από 500 είδη φυτών) (Jeffries, 2005). Προκαλεί ανεπανόρθωτες βλάβες στα φυτά-ξενιστές του, με λύση των ιστών τους (Lichens-park, 2014). Απώλειες εξαιτίας της προσβολής μπορεί να εμφανιστούν κατά την παραγωγή, την αποθήκευση αλλά και όσο τα προϊόντα βρίσκονται στην αγορά προς πώληση (Ramsey 1925 όπως αναφέρεται στους Mirza and Ahmad, 1988). Οι ασθένειες οι οποίες προκαλεί είναι γνωστές με περισσότερα από 60 ονόματα (Purdy, 1979), ανάλογα τον ξενιστή που έχει προσβάλει καθώς και το προσβεβλημένο μέρος του φυτού. Κοινές ασθένειες οι οποίες οφείλονται στον συγκεκριμένο μύκητα είναι η βαμβακώδης σήψη (cottony rot), η λευκή σήψη (white mold), η υδαρής μαλακή σήψη (watery soft rot) και η σήψη βλαστών (stem rot) (Agrios, 2005). Αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για τις καλλιέργειες των κραμβοειδών, αφού είναι το πιο κοινό παθογόνο αίτιο για τη σήψη των βλαστών τους (Jeffries, 2005)

1.2 Συμπτώματα και σημεία

Τα συμπτώματα και τα σημεία που προκαλούνται στους ξενιστές εξαιτίας της δράσης του παθογόνου, μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το είδος του προσβεβλημένου φυτού (Agrios, 2005). Πρώτο σύμπτωμα που εμφανίζεται σχεδόν σε όλα τα φυτά είναι υδαρείς στην όψη κηλίδες, οι οποίες σιγά σιγά αυξάνονται σε μέγεθος. Πάνω τους αναπτύσσεται λευκό μυκηλίου, εντός του οποίου έπειτα από 7-10 μέρες σχηματίζονται σκληρώτια (Abawi and Grogan, 1979). Τα σκληρώτια αποτελούν τις διαχειμάζουσες μορφές του μύκητα και είναι επιμήκεις ή πιο σπάνια σφαιρικές κατασκευές μεγέθους 1-30 mm (Wong and Willetts, 1975), οι οποίες εσωτερικά περιέχουν ανοιχτόχρωμο πλεκτέγγυμα και εξωτερικά έχουν σκληρό φλοιό, κύριο συστατικό του οποίου είναι η μελανίνη, η οποία εμποδίζει την υποβάθμιση της βλαστικότητάς τους από την ακτινοβολία (Sharma et al., 2015). Στον Καναδά έχουν παρατηρηθεί 3 τύποι σκληρωτίων i)τα ομαλά μαύρα, ii)τα ανώμαλα μαύρα και iii)τα καστανά σκληρώτια (Bardin and Huang, 2001).

Η προσβολή ξεκινάει κυρίως από τους βλαστούς, σε κάποιες περιπτώσεις όμως μπορεί να ξεκινήσει και από φύλλα ή από καρπούς αν αυτοί ακουμπούν στο έδαφος (πχ αγγούρι, μελιτζάνα) ή αν βρίσκονται σε επαφή με γειτονικά μολυσμένα φυτά. Κατά τα πρώτα στάδια της προσβολής τα συμπτώματα δεν είναι εμφανή, στην πορεία

όμως είναι ορατή σήψη των βλαστών που σταδιακά αποσυντίθενται και το φύλλωμα μαραίνεται, οδηγώντας στο θάνατο του φυτού (Agiros, 2005). Η αποσύνθεση των φυτικών κυττάρων εξελίσσεται συνεχώς εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης λυτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα το οξαλικό οξύ δημιουργεί ένα τοξικό περιβάλλον στους ιστούς του ξενιστή, οξειδώνοντας το άμεσο περιβάλλον και δεσμεύοντας το ασβέστιο στο κυτταρικό τοίχωμα, οδηγώντας έτσι σε λύση των φυτικών ιστών (Sharma et al., 2015).



Εικόνα 1 : Λευκό μυκήλιο και διακριτά μαύρα σκληρώτια σε κεφαλή λάχανου με προχωρημένη σήψη, από την περιοχή του Αγ. Γεωργίου Βέροιας



Εικόνα 2 : Ανάπτυξη λευκού βαμβακώδους μυκηλίου σε αποθηκευμένα καρότα σε εταιρία παραγωγής λαχανικών στην Ελβετία

1.2.1 Το παθογόνο

Ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* είναι ένα ασκομύκητας της οικογένειας Sclerotiniaceae, το γένος *Sclerotinia*, το οποίο περιγράφηκε λεπτομερώς για πρώτη φορά το 1979 από τον Purdy, παρότι ήταν ήδη ευρέως γνωστό για τις ασθένειες που προκαλούσε σε ποικίλες καλλιέργειες (Saharan - Naresh Mehta, 2008).

Αρχικά, το είδος ονομάστηκε *Peziza sclerotiorum* από την M. A. Libert το 1837, όμως στη συνέχεια ο Fuckel το 1870 δημιούργησε το γένος *Sclerotinia* οπότε και μετονόμασε το είδος σε *Sclerotinia libertiana* Fuckel (Purdy, 1979). Η ονομασία αυτή χρησιμοποιούνταν μέχρι και το 1924, όπου ο Wakefield θεώρησε πως δε συνάδει με τους Διεθνείς Κανόνες Βοτανικής Ονοματολογίας, οπότε και καθιερώθηκε η ονομασία *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, προς τιμή του Heinrich Anton de Bary που το είχε χρησιμοποιήσει πρώτος σε άρθρο του το 1884 (Purdy, 1979).

Συστηματική Κατάταξη	
Βασίλειο	Fungi
Φύλο	Ascomycetes
Υποφύλο	Pezizomycotina
Κλάση	Letiomycetes
Τάξη	Helotiales
Οικογένεια	Sclerotiniaceae
Γένος	<i>Sclerotinia</i>
Είδος	<i>S. sclerotiorum</i>

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2019)

Κατά τους θερινούς και πρώτους φθινοπωρινούς μήνες ο μύκητας βρίσκεται σε καταστολή της ανάπτυξής του, παραμένοντας υπό μορφή σκληρωτίων στην επιφάνεια του εδάφους ή σε κοιλότητες προσβεβλημένων ιστών. Στην κατάσταση αυτή παραμένει μέχρι οι κλιματικές συνθήκες κάθε περιοχής φτάσουν σε ικανοποιητικά για την ανάπτυξή του επίπεδα (Τζάμος, 2007). Τα σκληρώτια βλαστάνουν σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 6 έως και 20°C, ανάλογα πάντα και με την υγρασία εδάφους (Sun and Yang, 2000).

Ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* μπορεί να θεωρηθεί όχι μόνο παθογόνο εδάφους, αλλά και ότι παράγει εναέριο μόλυσμα, αφού τα σκληρώτια βλαστάνουν με δύο διαφορετικούς τρόπους. (Sharma et al., 2015).

Ο πρώτος τρόπος είναι όταν από το σκληρώτιο προκύπτει απευθείας μυκήλιο. Η προσβολή αυτή συμβαίνει κυρίως στην επιφάνεια του εδάφους ή μέσα σ αυτό, όπου οι υφές που δημιουργούνται εγκαθίστανται πρώτα στη νεκρή οργανική ύλη του εδάφους και από εκεί παρουσία εξωγενών θρεπτικών συστατικών το μυκήλιο αναπτύσσεται και προσβάλλει τους ιστούς των ξενιστών που βρίσκονται υπογείως (ρίζα) ή κοντά στην επιφάνεια του εδάφους (λαιμός) (Sharma et al., 2015).

Ο πιο κοινός όμως τρόπος προσβολής στη φύση είναι όταν από τα σκληρώτια σχηματίζονται αποθήκια, που φέρουν ασκούς με ασκοσπόρια (Sharma et al., 2015). Όταν τα ασκοσπόρια ελευθερωθούν από τους ασκούς μεταφέρονται με τον άνεμο σε γειτονικά νεκρά ή γηρασμένα φυτικά μέρη, όπου θα εγκατασταθούν, θα βλαστήσουν

και θα προσβάλουν και τα υγιή μέρη των φυτών, με το μυκήλιο που παράγουν. Τα ασκοσπόρια μπορούν να παραμείνουν ζωντανά για κάποιο χρονικό διάστημα στην επιφάνεια που εγκαθίστανται και να βλαστήσουν, όταν οι συνθήκες τα ευνοήσουν (Purdy, 1979). Συνήθως, σ' αυτή την περίπτωση θα προκύψουν προσβολές από τα σκληρώτια που βρίσκονται στα πρώτα 2-3 cm του εδάφους, μιας και σπανίως διαμορφώνονται αποθήκια με στέλεχος μεγαλύτερο των 3 cm (Abawi and Grogan, 1979).

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* είναι η ένταση του φωτός, η υγρασία και η θερμοκρασία (Abawi, 1975). Ενδεικτικά, για την ανάπτυξη του μυκηλίου οι ιδανικές θερμοκρασίες είναι από 18 έως 25°C (Abawi, 1975), ενώ αναστολή της υφίσταται όταν η θερμοκρασία είναι μικρότερη των 0 °C καθώς και όταν υπερβαίνει τους 32 °C (Purdy, 1979). Αντίστοιχα, για τη βλάστηση των σκληρωτίων το ποσοστό βλαστικότητας είναι υψηλό σε συνθήκες έντονου φωτός (120 με 130 mol m⁻² s⁻¹), υψηλής εδαφικής υγρασίας και θερμοκρασίας στους 20°C (Sun and Yang, 2000). Τέλος, ο αριθμός των παραγόμενων ασκοσπορίων είναι μεγάλος κάτω από συνθήκες χαμηλού φωτισμού (80 με 90 mol m⁻² s⁻¹), 25°C και μειωμένης υγρασίας εδάφους (Sun and Yang, 2000).

Γενικότερα ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* παρουσιάζεται κυρίως σε ψυχρά και υγρά κλίματα, χωρίς όμως αυτό να αποκλείει την εμφάνισή του και σε κλίματα που θεωρούνται θερμά και ξηρά (Purdy, 1979). Ακόμη, δεν μπορεί να αγνοηθεί το γεγονός ότι για να καλυφθούν οι απαιτήσεις της αγοράς σήμερα, πολλές καλλιέργειες είναι θερμοκηπιακές. Εντός των θερμοκηπίων οι συνθήκες που επικρατούν κατά την ανάπτυξη των φυτών είναι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες και με υψηλή σχετική υγρασία, καθιστώντας έτσι ένα περιβάλλον «φιλικό» για την ανάπτυξη του μύκητα (Wan et al. 1999).

1.3 Μέθοδοι Αντιμετώπισης της ασθένειας

Η αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από το μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* γίνεται κυρίως με χρήση χημικών σκευασμάτων, ενώ η εφαρμογή παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης κερδίζει συνεχώς έδαφος. Ήδη στο εμπόριο κυκλοφορούν και κάποια βιολογικά σκευάσματα.

Σε αρχικές αναφορές σχετικά με τη βιολογία του παθογόνου αναφέρεται ότι τα σκληρώτια παραμένουν ζωντανά στο έδαφος μόνο ένα έτος (Davis, 1925 όπως

αναφέρεται από τους Brustolin et al., 2016). Η θεωρία αυτή όμως με βάση μελέτες που έγιναν τις επόμενες δεκαετίες καταρρίφθηκε καθώς αποδείχθηκε ότι τα σκληρώτια μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος, αν και σε μικρό ποσοστό, ακόμη και 7 χρόνια (Ben et al. 1993). Για το λόγο αυτό η χρήση καλλιεργητικών μέτρων και προγραμμάτων βραχυχρόνιας αμειψισποράς δεν αποτελούν τόσο αποτελεσματικό τρόπο αντιμετώπισης της ασθένειας (Nelson, 1998).

1.3.1 Χημική Καταπολέμηση

Σύμφωνα με τις οδηγίες του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων η χημική καταπολέμηση της σκληρωτινίας μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους :

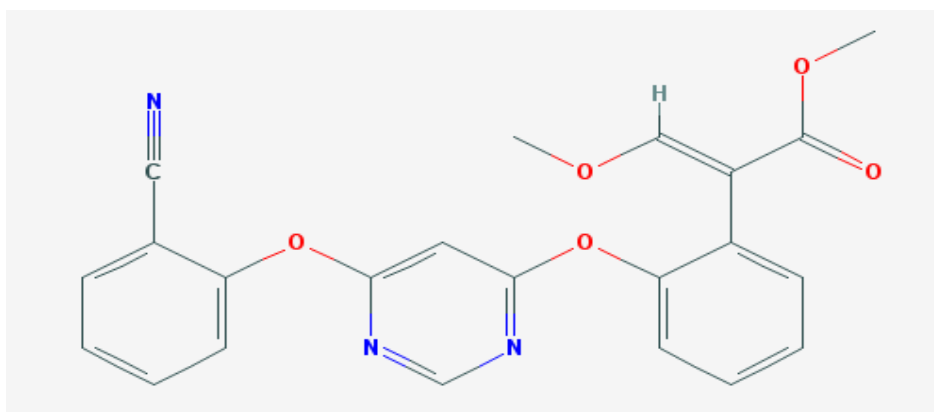
1. Με απολύμανση του εδάφους πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας με ατμό ή χρήση χημικών σκευασμάτων π.χ. dazomet
2. Με ψεκασμό χημικών σκευασμάτων άμεσα μετά την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων πχ azoxystrobin , chlorothalonil (Anon. 2012)

Δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ή δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από το μύκητα *S. sclerotiorum* είναι azoxystrobin, chlorothalonil, cyprodinil, fluazinam, penconazole .

1.3.1.1 Azoxystrobin

Ανήκει στην ομάδα των στρομπιλουρινών ή β-μεθοξυακρυλικών χημικών ενώσεων, η οποία είναι μέρος της ευρύτερης ομάδας των Qo (Quinone “outside”) παρεμποδιστών, που στόχο έχουν την παρεμπόδιση του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας, ενός συστήματος δηλαδή που συμβάλει στην παραγωγή ενέργειας του παθογόνου. Οι στρομπιλουρίνες προέκυψαν ως παράγωγα αρχικά των φυσικών ενώσεων strobilurins, oudemansins και myxothiazol και εμφανίστηκαν στην γεωργική πράξη για πρώτη φορά το 1996. Πλέον, λόγω της διάσπασης των ενώσεων από το φως και της πτητικότητάς τους, οι εταιρίες παράγουν χημικά μόρια λιγότερο πτητικά. Το azoxystrobin συγκεκριμένα κυκλοφορεί με τα εμπορικά ονόματα Quadris, Ortiva και Amistar και η δράση του χαρακτηρίζεται από διασυστηματική κίνηση και η χρήση του γίνεται προληπτικά ή θεραπευτικά για την καταπολέμηση ασθενειών που προκαλούνται από τους παρακάτω φυτοπαθογόνους μύκητες:

Erysiphe graminis, *Puccinia* spp, *Sphaerotheca fulliginea* κ.ά. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017).



Εικόνα 3 : Συντακτικός χημικός τύπος του μορίου της δραστικής ουσίας azoxystrobin (Anon. 2019a)

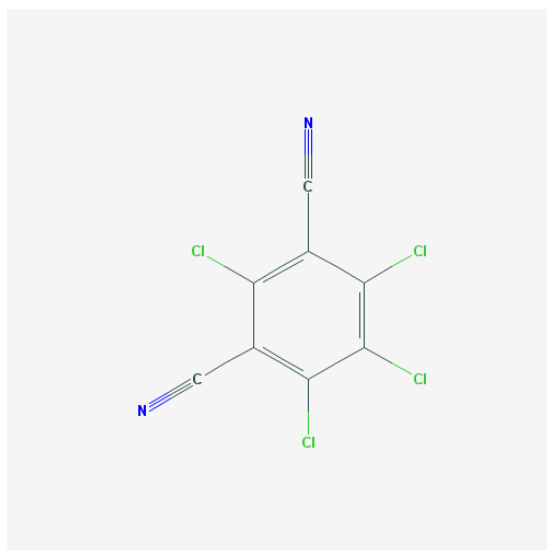
Όπως προέκυψε από την βιβλιογραφία, κατά την υλοποίηση πειραμάτων αξιολόγησης των στρομπιλουρινών *in vitro*, γινόταν προσθήκη σαλικυλυδροξαμικού οξέος (SHAM) (Duan et al., 2012, Liang et al. , 2015).

Η χημική ουσία SHAM αρχικά θεωρούνταν ως αντιφυματικός παράγοντας, εξαιτίας του υδροξαμικού οξέος που φέρει. (Urbanski 1950 όπως αναφέρεται από τον Kehl 1982). Έπειτα από έρευνες, μεταξύ των υπόλοιπων της δράσεών της, ως προς τους μύκητες προσδιορίστηκε ότι αναστέλλει το βιολογικό μονοπάτι της δευτερεύουσας αναπνοής που λειτουργεί με εναλλακτική οξειδάση (AOX), η οποία ενεργοποιείται εξαιτίας της δράσης των στρομπιλουρινών, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε εμποδίζουν την κύρια αναπνευστική αλυσίδα (Wood and Hollomon, 2003).

1.3.1.2 Chlorothalonil

Εμφανίστηκε πρώτη φορά στη γεωργική πράξη ως φυτοπροστατευτικό προϊόν τη δεκαετία του '60 και μέχρι σήμερα αποτελούσε ένα από τα πιο σημαντικά μυκητοκτόνα για την προστασία των κηπευτικών και καλλωπιστικών φυτών καθώς και φυτών μεγάλης καλλιέργειας, έναντι διαφόρων ασθενειών όπως ο περονόσπορος της πατάτας, ασθένειες που προκαλούνται από είδη του γένους *Botrytis* κ.ά.. Σύμφωνα με τη χημική δομή του κατατάσσεται στην ομάδα των χλωροφαινολών, αλλά όχι στους αρωματικούς υδρογονάνθρακες παρότι είναι φαινολική ένωση. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017). Κατά τη δράση του δεσμεύει το μόριο γλουταθιόνη

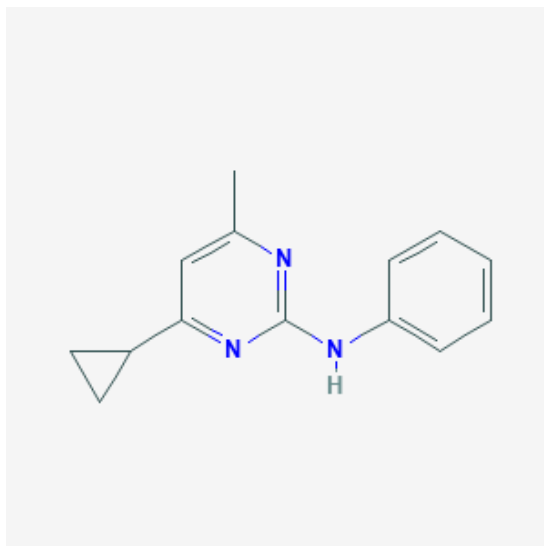
των κυττάρων των μυκήτων, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η λειτουργία όλων των ενζύμων που εξαρτώνται από το μόριο αυτό (Cox, 1997).



Εικόνα 4 : Συντακτικός χημικός τύπος του μορίου της δραστικής ουσίας chlorothaloniol (Anon. 2019b)

1.3.1.3 Cyprodinil

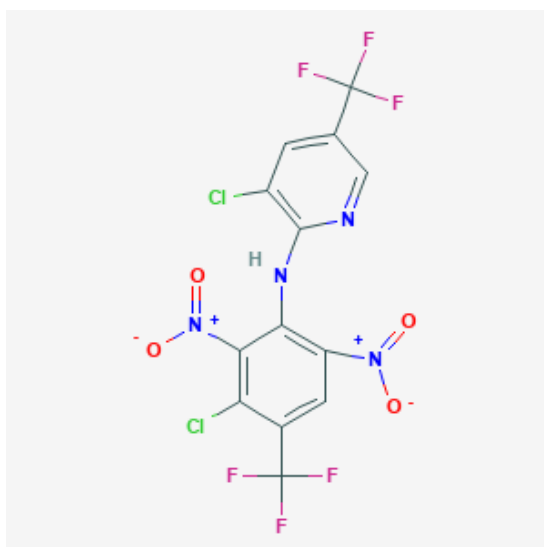
Είναι ένα διασυστηματικό, ευρέους φάσματος δράσης μυκητοκτόνο, το οποίο ανήκει στην ομάδα των ανιλνοπυριμιδινών, έχοντας προληπτική και θεραπευτική δράση. Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στη γεωργική πράξη το 1994 και χρησιμοποιείται κυρίως για την αντιμετώπιση του βοτρυτή (*Botrytis cinerea*) της φαιάς σήψης (*Monilinia fructicola*) και των φουζικλάδιων (*Venturia inaequalis*, *V. pirina*). Ο μηχανισμός δράσης του σχετίζεται με την παρεμπόδιση της έκκρισης λυτικών ενζύμων, τα οποία παράγουν οι μύκητες για να αποδιοργανώσουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και να προσβάλλουν τους ιστούς τους (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι είναι μικρής διαλυτότητας και οι πιθανότητες να εισέλθει στα υπόγεια ύδατα είναι ελάχιστες, είναι όμως τοξικό για τα θηλαστικά και υπάρχει πιθανότητα βιοσυσσώρευσής του (Anon. 2019c).



Εικόνα 5: Συντακτικός χημικός τύπος του μορίου της δραστικής ουσίας cyprodinil (Anon. 2019d)

1.3.1.4 Fluazinam

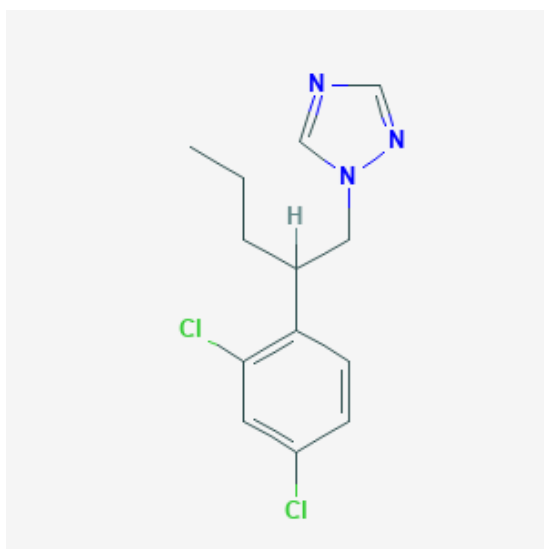
Είναι προστατευτικό ευρείας χρήσης μυκητοκτόνο ενάντια σε προσβολές εδάφους σε διάφορες καλλιέργειες (Anon. 2007) . Ανήκει στην ομάδα των φαινυλοπυριδιναμινών που στόχο έχουν τη διακοπή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από το κυτοχρωμικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να εξαντλούνται τα αναπνευστικά υποστρώματα χωρίς την αντίστοιχη παραγωγή ενέργειας (ATP) από τα κύτταρα. Τελευταία, μελέτες έδειξαν διασταυρωτή ανθεκτικότητα του fluazinam με την ολιγομυκίνη, οπότε υπάρχει πιθανότητα η δράση του να οφείλεται στην παρεμπόδιση της συνθέσεως του ATP (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017).



Εικόνα 6: Συντακτικός χημικός τύπος του μορίου της δραστικής ουσίας fluazinam (Anon. 2019e)

1.3.1.5 Penconazole

Ανήκει στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών (SBIs) και συγκεκριμένα στην υποομάδα των τριαζολικών, τα οποία είναι μια ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του '60. Η συγκεκριμένη δραστική ουσία εμφανίστηκε πρώτη φορά το 1983 με το εμπορικό όνομα σκευάσματος, Topas, για τον έλεγχο Ασκομυκήτων, Βασιδιομυκήτων και Δευτερομυκήτων, (Pesticide Properties DataBase, 2007) κυρίως όμως ενάντια στα ωΐδια (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017).



Εικόνα 7: Συντακτικός χημικός τύπος του μορίου της δραστικής ουσίας penconazole (Anon. 2019f)

1.4 Βιολογική Αντιμετώπιση

Εξαιτίας της συνεχώς αναπτυσσόμενης ανθεκτικότητας του μύκητα έναντι των χημικών σκευασμάτων, καθώς και της περιβαλλοντικής επίπτωσης που έχουν, έχει δημιουργηθεί η ανάγκη για περαιτέρω έρευνες σχετικά με τη βιολογική αντιμετώπιση. Η επικρατέστερη ομάδα μικροοργανισμών ως υποσχόμενοι παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης είναι τα βακτήρια. Συγκεκριμένα, έχουν γίνει δοκιμές με επιτυχή αποτελέσματα στην *in vitro* ανάπτυξη μυκηλίου και στη βλάστηση ασκοσπορίων με διάφορα είδη των γενών *Bacillus* και *Pseudomonas* (Fernando et al., 2007, Sabaté et al., 2018). Επίσης, αν και αρκετά βακτήρια είναι

υποψήφιοι παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης, εμπορικό σκεύασμα υπάρχει για ένα μύκητα υπερπαρασίτο, το είδος *Coniothyrium minitans*, όπου η αντιμετώπιση της ασθένειας προβλέπει ενσωμάτωση του υπερπαρασίτου στο έδαφος με αποτελέσματα την καταστροφή των διαχειμαζόντων σκληρωτίων (Gerlagh et al., 1999, Agrios, 2005).

1.5 Σκοπός Διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής υπήρξε η δοκιμή αποτελεσματικότητας των δραστικών ουσιών azoxystrobin, chlorothalonil, cyprodinil, fluazinam και penconazole στην αναστολή ανάπτυξης του μυκηλίου και στην παραγωγή σκληρωτίων *in vitro* του φυτοπαθογόνου μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της ουσίας SHAM σε συγκέντρωση 100ppm στην ανάπτυξη μυκηλίου και σχηματισμό σκληρωτίων του μύκητα. Τέλος, με την εργασία αυτή μελετήθηκε η ποικιλομορφία ανάπτυξης των απομονώσεων σε έναν συγκεκριμένο τυχαίο αγρό με κολοκυνθοειδή, ενώ η απομόνωση από το θερμοκήπιο αποτελούσε εξωτερικό μάρτυρα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

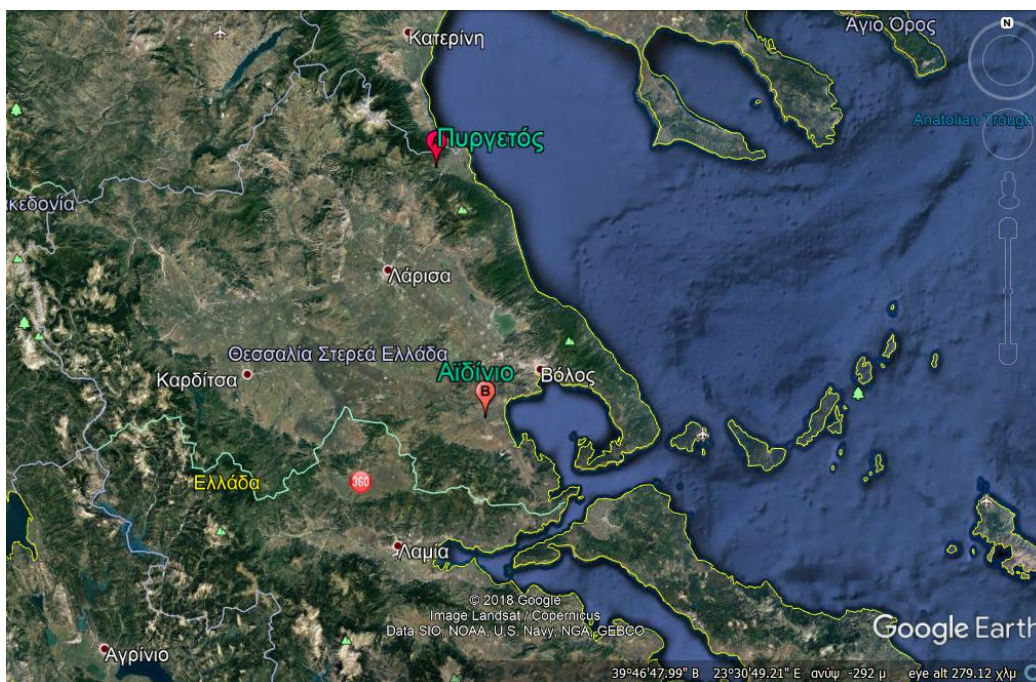
Καρποί και βλαστοί κολοκυνθοειδών (κολοκυθιά, αγγουριά) με εμφανή συμπτώματα προσβολής από *S.sclerotiorum* που έφεραν σημεία του παθογόνου συλλέχθηκαν το Μάιο και το Δεκέμβριο του 2018. Τα συμπτώματα ήταν υγρή σήψη και τα σημεία λευκό βαμβακώδες μυκήλιο και ευδιάκριτα μαύρα, ποικίλων μεγεθών και σχημάτων, σκληρώτια (Εικ. 8 και 9). Συνολικά συλλέχθηκαν 12 δείγματα από 1 θερμοκήπιο και 1 αγρό, όπως φαίνονται στον χάρτη (Εικ. 10). Το δείγμα αγγουριάς προερχόταν από θερμοκήπιο υδροπονικής καλλιέργειας, στο οποίο είχαν γίνει αρκετές εφαρμογές με μυκητοκτόνα και άλλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ενώ τα δείγματα κολοκυθιάς προέρχονταν από αγρό στον οποίο είναι άγνωστο αν είχαν πραγματοποιηθεί φυτοπροστατευτικές επεμβάσεις (Πιν. 2).



Εικόνα 8: Βλαστός αγγουριάς με εμφανές λευκό μυκήλιο και μαύρα ευμεγέθη σκληρώτια εντός και εκτός των ιστών



Εικόνα 9: Καρπός κολοκυθιάς με εμφανή υγρή σήψη και μαύρα ευμεγέθη σκληρώτια στην επιφάνειά του.

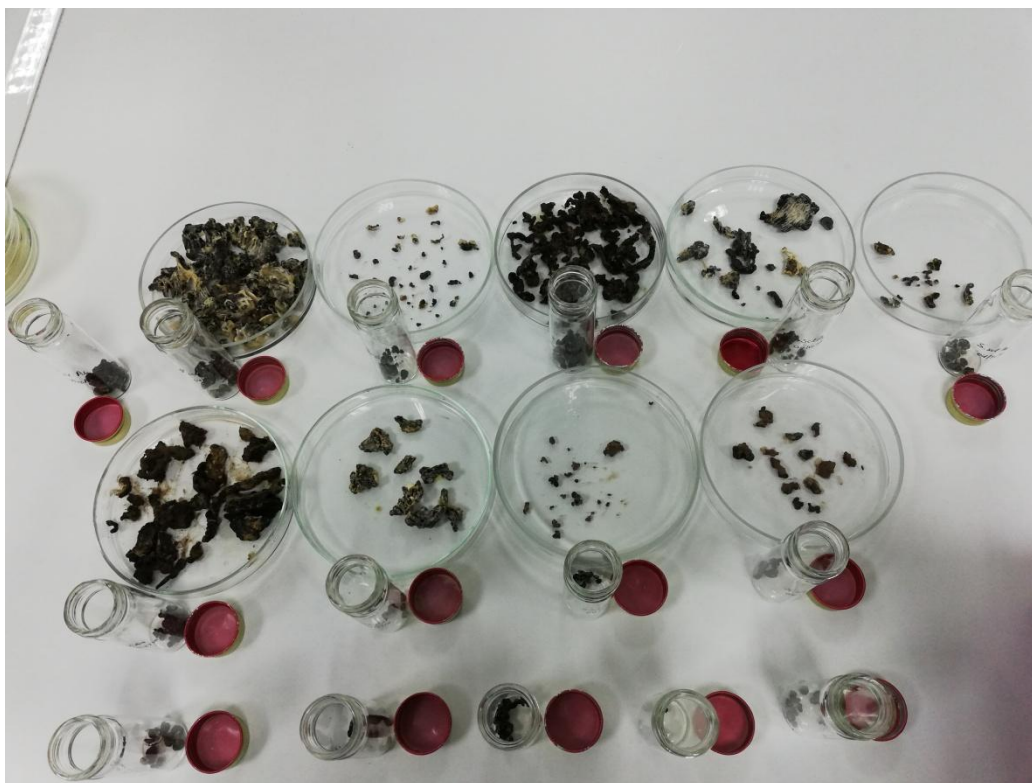


Εικόνα 10: Περιοχές όπου πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία από προσβεβλημένες καλλιέργειες. Περιοχή Α: Πυργετός Ν. Λαρίσης, Περιοχή Β: Αϊδίνιο Ν. Μαγνησίας

Περιοχές Δειγματοληψίας	Κωδικός Απομόνωσης
A	MS1
B	A1, A4, A5, A8, A11, A12, A13, A14, A16, A17, A18

Πίνακας 2: Κωδικοί απομονώσεων ανά περιοχή δειγματοληψίας

Αμέσως μετά τη δειγματοληψία ακολούθησε η επεξεργασία των δειγμάτων, όπου συλλέχθηκαν τα σκληρώτια που υπήρχαν τόσο στην επιφάνεια όσο και στο εσωτερικό των ιστών. Στη συνέχεια, τα σκληρώτια τοποθετήθηκαν σε ανοιχτά τριβλία Petri, για 7 ημέρες, σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στεγνώσουν. Κατόπιν αποθηκεύονταν σε φιαλίδια τύπου Universal, σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας.



Εικόνα 11: Σκληρώτια του μύκητα *S. sclerotiorum* μετά τη συλλογή από προσβεβλημένους ιστούς

2.2 Ανάπτυξη καθαρής καλλιέργειας *S. sclerotiorum* από σκληρώτιο

Το πρωτόκολλο που υιοθετήθηκε για την ανάπτυξη καθαρής καλλιέργειας, του φυτοπαθογόνου μύκητα, από κάθε ένα σκληρώτιο, προέκυψε μετά από προσαρμογή διαφόρων μεθόδων που έχουν ήδη περιγραφεί (Karatia et al., 2016, Mahalinga et al., 2017, Matheron, 1993, Mirza and Ahmad, 1988). Αρχικά τα σκληρώτια εμβαπτίζονταν για μερικά δευτερόλεπτα σε απιονισμένο αποστειρωμένο νερό, ώστε να απομακρυνθούν από πάνω τους τυχόν ξένα σώματα και χώμα. Έπειτα με αποστειρωμένη λαβίδα μεταφέρονταν σε διάλυμα χλωρίνης 3% για 90 sec. και στη συνέχεια ακολουθούσαν 3 διαδοχικές πλύσεις με απιονισμένο αποστειρωμένο νερό. Τέλος, μεταφέρονταν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί ώστε να αφαιρεθεί το ελεύθερο νερό από πάνω τους και μετά τοποθετούνταν ανά 2, αντιδιαμετρικά στις άκρες ενός τριβλίου Petri, διαμέτρου 9cm με θρεπτικό υλικό Potato Glycose Agar (PGA).

Potato Glycose Agar (1 lt)
200 g πατάτα
15 g άγαρ
16,5 g γλυκόζη
1 lt νερό

Πίνακας 3: Συστατικά παρασκευής θρεπτικού υλικού (Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο)

Στη συνέχεια τα τριβλία τοποθετούνταν στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C για επώαση. Μετά από 48 έως 72 ώρες, από τις αποικίες που είχαν εμφανιστεί ακτίνας 3 cm, γινόταν μεταφορά τμήματος μυκηλίου από την περιφέρεια της αποικίας σε σωλήνες με θρεπτικό υλικό PGA. Τέλος, οι σωλήνες επωάζονταν στους 25°C για 48 ώρες και ένα τμήμα μυκηλίου από την περιφέρεια της αποικίας μεταφερόταν εκ νέου σε τριβλίο με θρεπτικό υλικό PGA για ανάπτυξη αποικίας, ώστε να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω στις δοκιμές αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων όπως περιγράφονται σε επόμενη παράγραφο.

2.3 Αποτελεσματικότητα μυκητοκτόνων στην αναστολή ανάπτυξης μυκηλίου και παραγωγής σκληρωτίων του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων (azoxystrobin, chlorothalonil, cyprodinil, fluazinam και penconazole) οι δοκιμές έγιναν βάσει

πρωτοκόλλων της Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) (Stammler, 2008).

Για όλες τις δραστικές ουσίες των σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, οι τελικές συγκεντρώσεις στο θρεπτικό υπόστρωμα ήταν 10 – 1 – 0,1 – 0,01 – 0,001 – 0 ppm.

Τα σκευάσματα διαλύονταν σε απιονισμένο αποστειρωμένο νερό και προσθέτονταν στο θρεπτικό υπόστρωμα PGA, σε θερμοκρασία περίπου 55°C και στη συνέχεια απλωνόταν σε τριβλία Petri διαμέτρου 9 cm.

Σε όλες τις περιπτώσεις δίσκος μυκηλίου διαμέτρου 4 mm, ο οποίος είχε αφαιρεθεί με φελλοτρυπητήρα από μία απομόνωση (MS1) προστέθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις του κάθε μυκητοκτόνου και υπολογιζόταν η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC), δηλαδή η ελάχιστη συγκέντρωση που δεν παρατηρούνταν ανάπτυξη μυκηλίου. Για τις υπόλοιπες απομονώσεις, τμήματα μυκηλίου, διαμέτρου 4 mm, τοποθετούνταν σε τριβλία που περιείχαν τη MIC, την αμέσως μικρότερη συγκέντρωση και τη μηδενική συγκέντρωση (μάρτυρας) και τοποθετούνταν στον επωαστικό θάλαμο στους 25 °C για 40 ώρες, διάστημα στο οποίο το μυκήλιο του μάρτυρα είχε αναπτυχθεί αρκετά, χωρίς όμως να χει φτάσει στα τοιχώματα του τριβλίου.

Στην περίπτωση του ελέγχου αποτελεσματικότητας του azoxystrobin έγινε προσθήκη SHAM με τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό υπόστρωμα 100 ppm. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση της δραστικής ουσίας SHAM ήταν η μεθανόλη και η συνολική ποσότητά της ήταν λιγότερη από 1% του συνολικού όγκου PGA. Η προσθήκη SHAM στο θρεπτικό υλικό, έγινε ταυτόχρονα με την προσθήκη azoxystrobin και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση του διαλύματος .

Παράλληλα για να διερευνηθεί πιθανή παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου από τη δράση της δ.ο. SHAM , πραγματοποιήθηκε δοκιμή με προσθήκη SHAM σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PGA, όπου η συγκέντρωσή της δ.ο. ήταν 0 – 25 και 100 ppm. Έπειτα η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν όμοια με τις περιπτώσεις στις οποίες εξεταζόταν η αποτελεσματικότητα κάποιου μυκητοκτόνου.

2.3.1 Εκτίμηση αποτελεσματικότητας

Για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων, μετά το πέρας 40 ωρών επώασης στους 25°C, γινόταν μέτρηση δύο κάθετων διαμέτρων της αποικίας και υπολογιζόταν η συνολική επιφάνεια της αποικίας, με την παραδοχή ότι η ανάπτυξη της αποικίας ήταν σε μορφή δίσκου.

Οι δύο κάθετοι διάμετροι προέκυπταν από το μέσο όρο των δύο διαμέτρων των 3 επαναλήψεων του πειράματος.

Έπειτα, για μία απομόνωση, την MS1, τα τριβλία επανατοποθετούνταν στον επωαστικό θάλαμο για 10 ημέρες, έως ότου να σχηματιστούν σκληρώτια. Κατόπιν, γινόταν καταμέτρηση των σκληρωτίων από κάθε τριβλίο και συλλέγονταν σε γυάλινα φιαλίδια και τοποθετούνταν στους 72°C για 3-4 ημέρες, ώστε να απολέσουν όλη την υγρασία. Στη συνέχεια ζυγίζονταν και καταγραφόταν το ξηρό βάρος τους.

2.4. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

2.4.1. Υπολογισμός ποσοστού αναστολής ανάπτυξης επιφάνειας μυκηλίου

Για τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων, αρχικά από το μέσο όρο των 3 επαναλήψεων υπολογίστηκε η επιφάνεια του μυκηλιακού δίσκου που είχε αναπτυχθεί. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης του μυκηλίου σύμφωνα με τον τύπο :

$$\frac{(\text{επιφάνεια μάρτυρα} - \text{επιφάνεια δοκιμής}) * 100}{\text{επιφάνεια μαρτυρα}}$$

2.4.2. Υπολογισμός αποτελεσματικής συγκέντρωσης EC50

EC50 ορίζεται ως η μέση αποτελεσματική συγκέντρωση, συγκέντρωση δηλαδή της δραστικής ουσίας επαρκής για να αναστείλει κατά 50% την ανάπτυξη του μυκηλίου. Ο υπολογισμός της στην παρούσα εργασία έγινε στατιστικώς με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου, από τον οποίο προκύπτει μια σιγμοειδής καμπύλη, στην οποία φαίνεται που είναι το μέσο, ανάμεσα στην ελάχιστη και μέγιστη επίδραση που μπορεί να έχει η δραστική ουσία (Anon. 2019g).

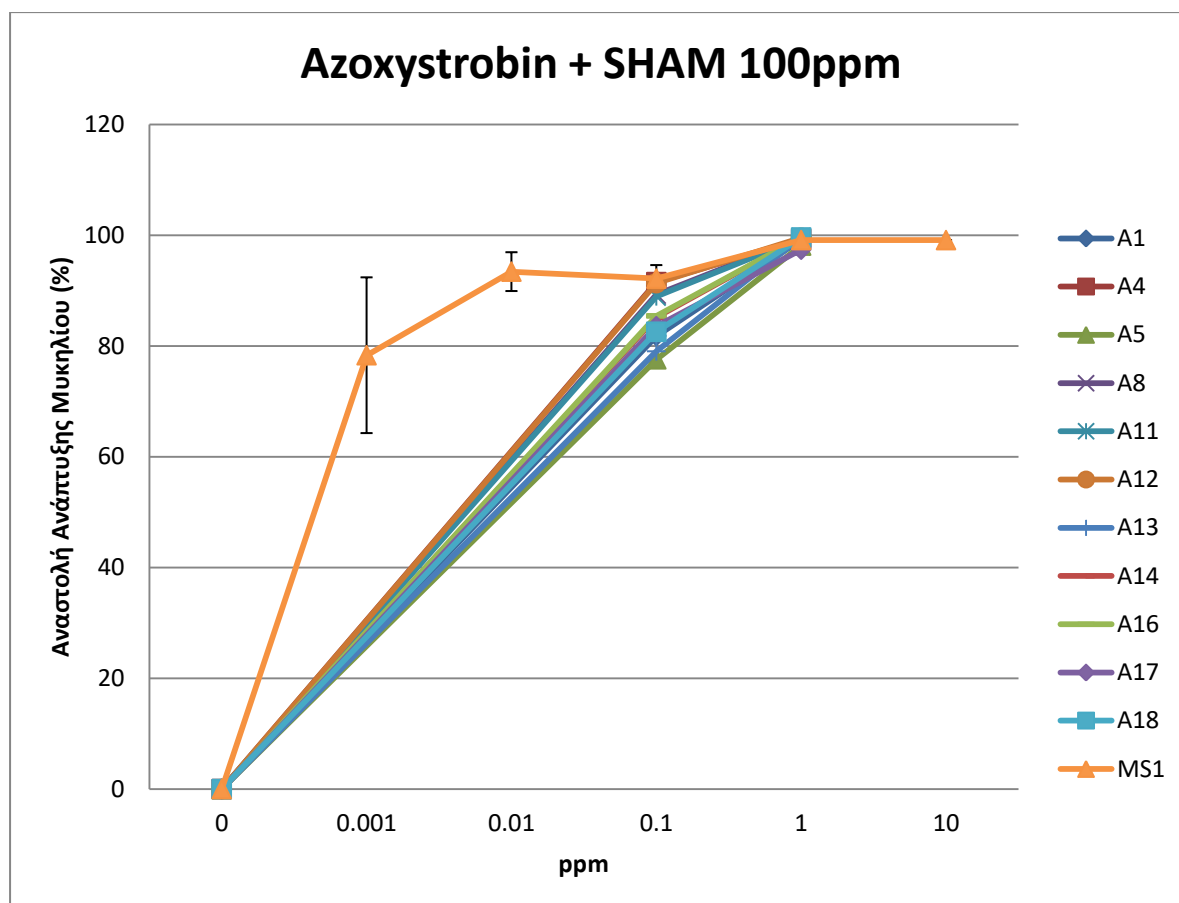
$$Y = \frac{\exp(a_1 * (X - IP))}{1 + \exp(a_1 * (X - IP))} * SP$$

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

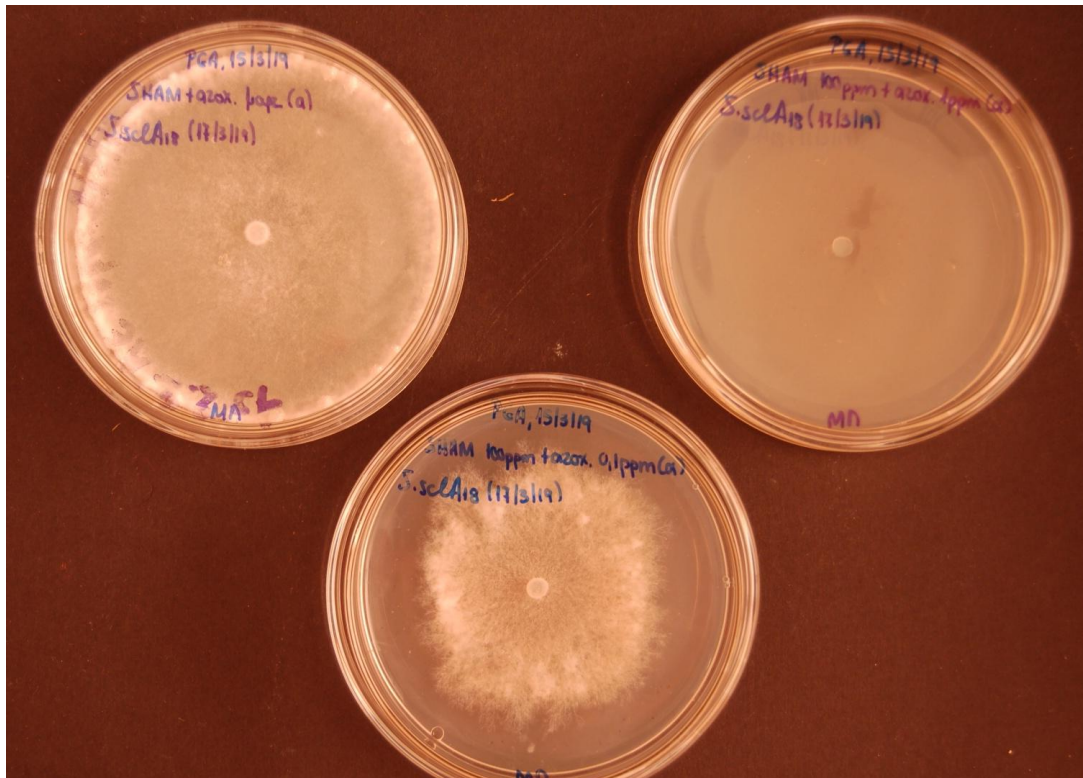
3.1. Αποτελεσματικότητα δραστικών ουσιών

3.1.1. Azoxystrobin

Η αποτελεσματικότητα του azoxystrobin εξετάστηκε σε 12 απομονώσεις, οι οποίες όπως προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση ANOVA και όπως φαίνεται και στο διάγραμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Πειραματικά βρέθηκε ότι παρουσία 100 ppm SHAM, η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) ήταν 1 ppm, ενώ η EC50 υπολογίστηκε μικρότερη από 0,001 ppm.



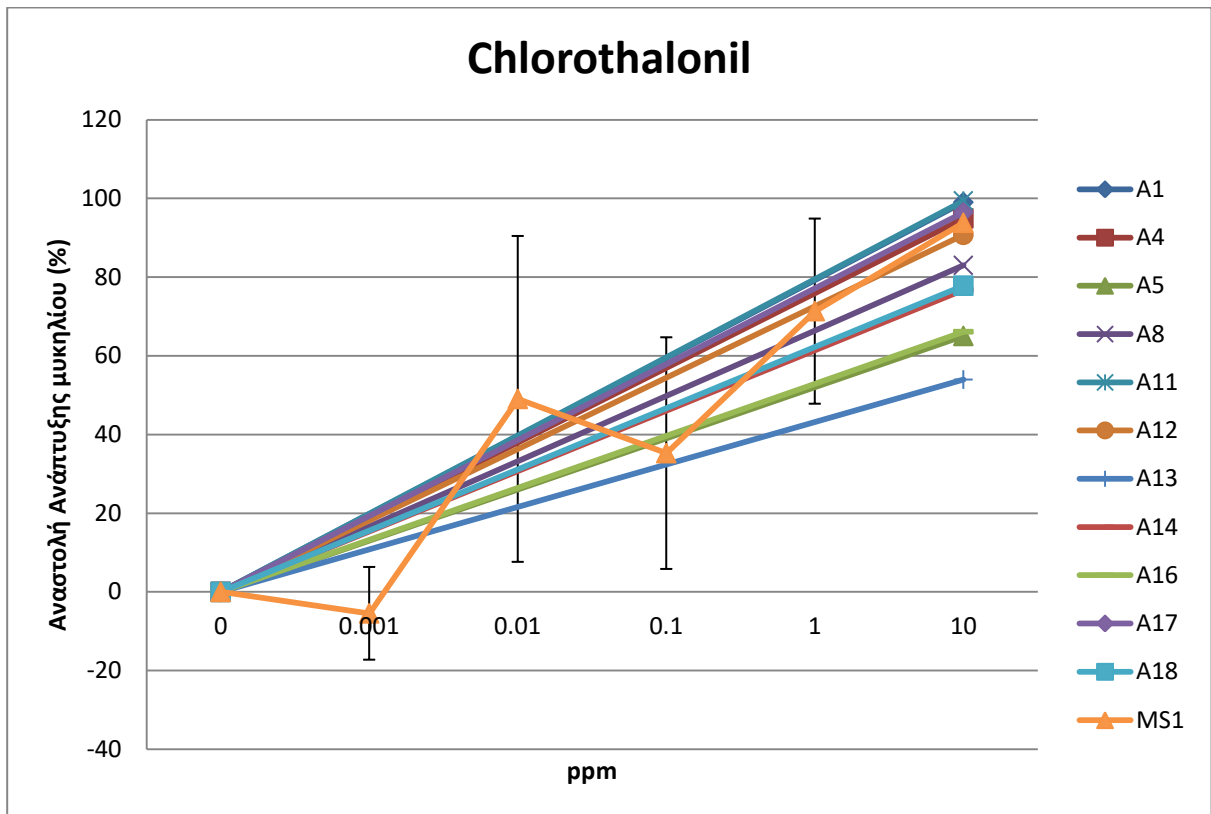
Γράφημα 1 : Αναστολή ανάπτυξης μυκηλίου των απομονώσεων *S. sclerotiorum* στις συγκεντρώσεις 0 – 0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 – 10 ppm azoxystrobin και 100 ppm SHAM σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PGA



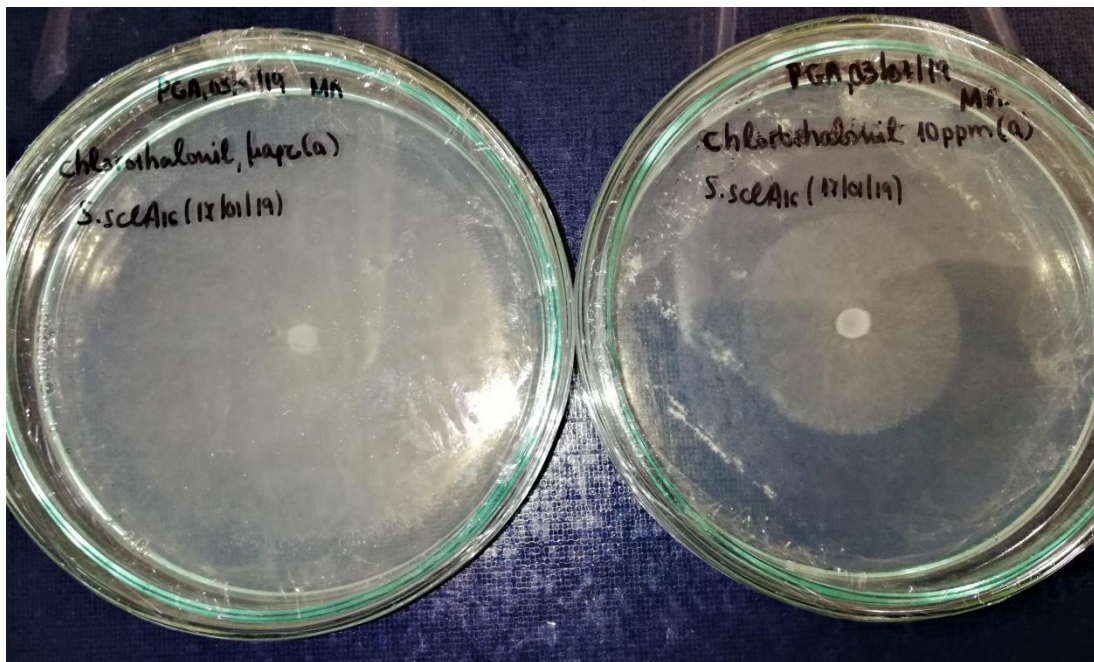
Εικόνα 12: Ανάπτυξη μυκηλίου *S. sclerotiorum* σε τρυβλία τύπου Petri 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PGA, 100ppm SHAM και 0(αριστερά), 0,1(κέντρο), και 1(δεξιά) ppm azoxystrobin.

3.1.2. Chlorothalonil

Όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα, υπάρχει ποικιλομορφία ως προς την ανταπόκριση των 12 απομονώσεων στην δραστική ουσία chlorothalonil, επομένως διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Από τα πειράματα δεν προσδιορίστηκε ακριβώς η MIC, διότι ακόμα και στα 10 ppm δ.ο. υπήρξε ανάπτυξη μυκηλίου, επομένως είναι μεγαλύτερη από αυτή την τιμή. Η EC50 υπολογίστηκε ίση με 0,334 ppm.



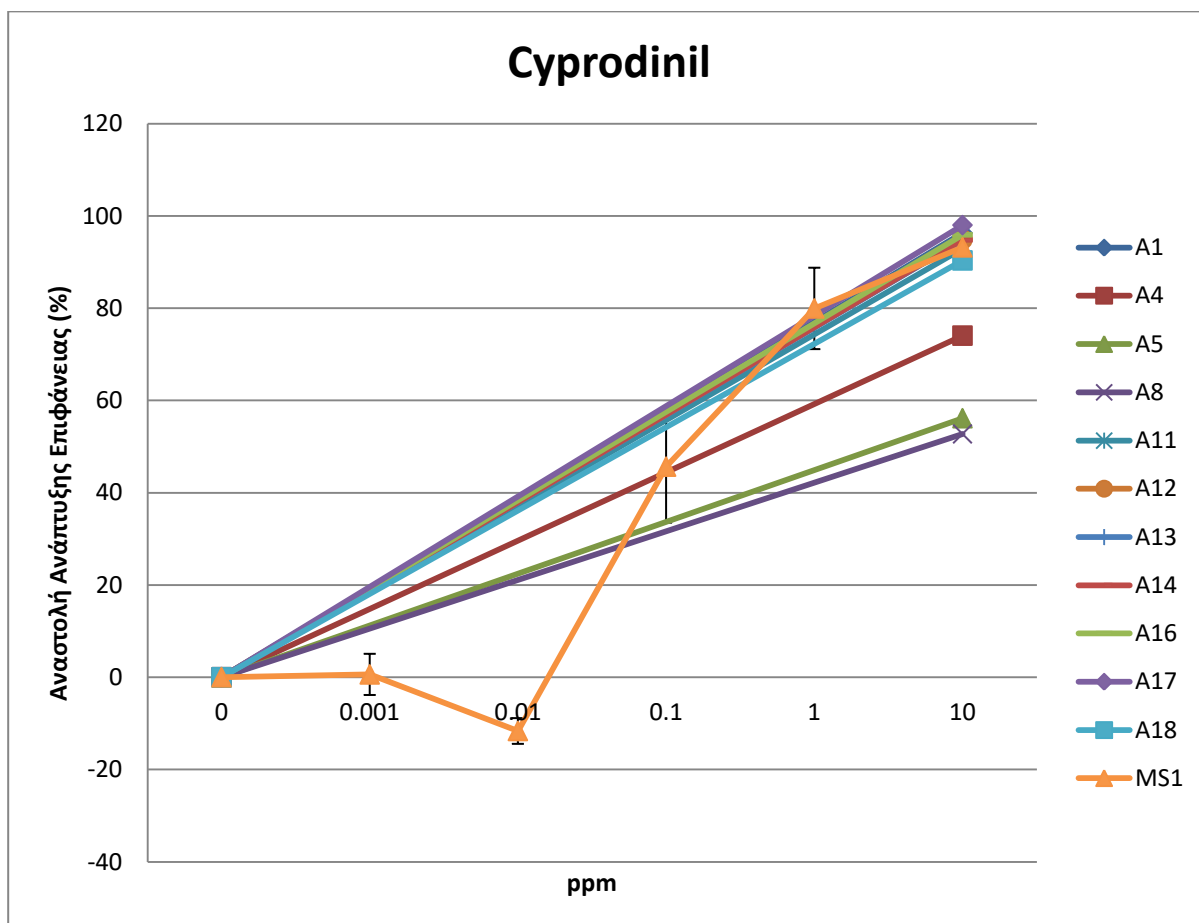
Γράφημα 2 : Αναστολή ανάπτυξης μυκηλίου των απομονώσεων *S. sclerotiorum* στις συγκεντρώσεις 0 – 0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 -10 ppm chlorothalonil σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PGA



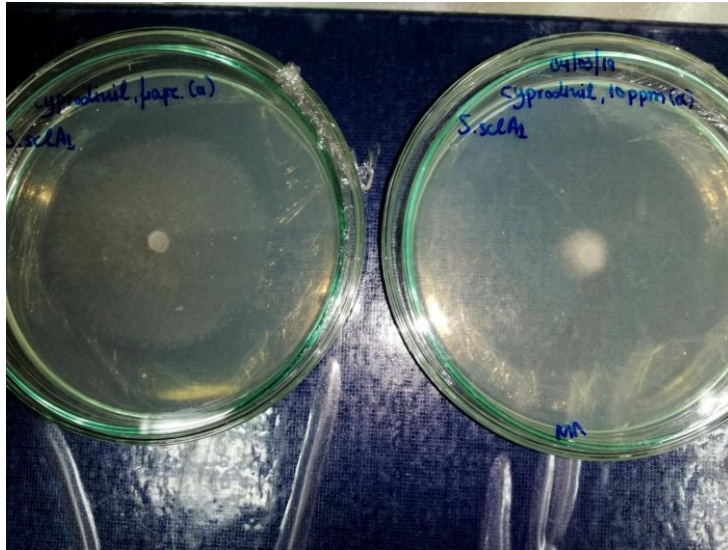
Εικόνα 13: Ανάπτυξη μυκηλίου *S. sclerotiorum* σε τρυβλία τύπου Petri 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PGA και 0 (αριστερά) και 10(δεξιά) ppm chlorothalonil.

3.1.3. Cyprodinil

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τη δραστική ουσία cyprodinil, όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα προέκυψε ότι υπάρχει ποικιλομορφία ως προς την ανταπόκρισή τους στη δράση της ουσίας, δίνοντας έτσι ένα αποτέλεσμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των απομονώσεων. Η MIC προέκυψε ότι είναι μεγαλύτερη από 10 ppm, ενώ η EC50 υπολογίστηκε στατιστικά, ίση με 0,096 ppm.



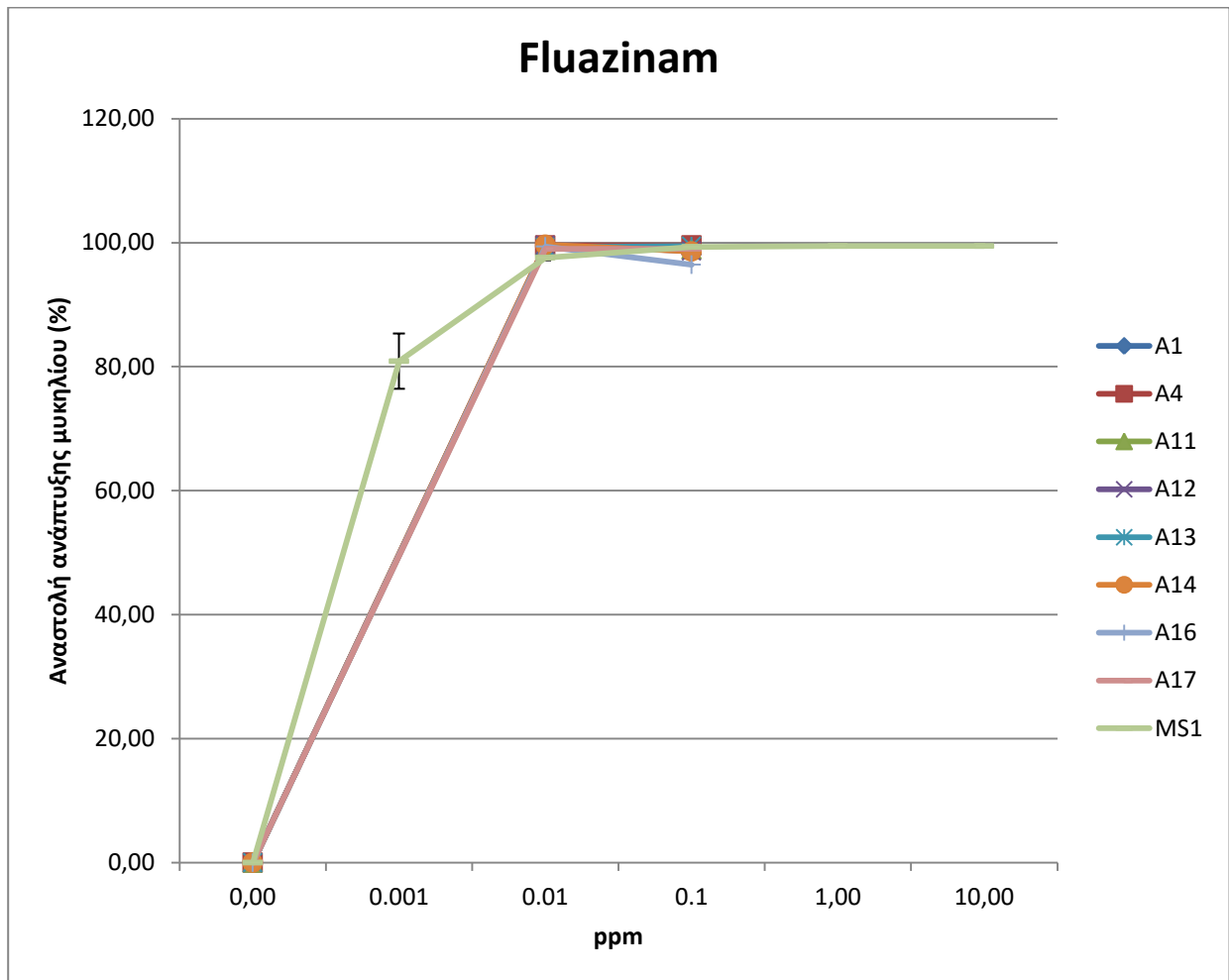
Γράφημα 3: Αναστολή ανάπτυξης μυκηλίου υων απομονώσεων *S. sclerotiorum* στις συγκεντρώσεις 0 – 0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 -10 ppm cyprodinil σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PGA.



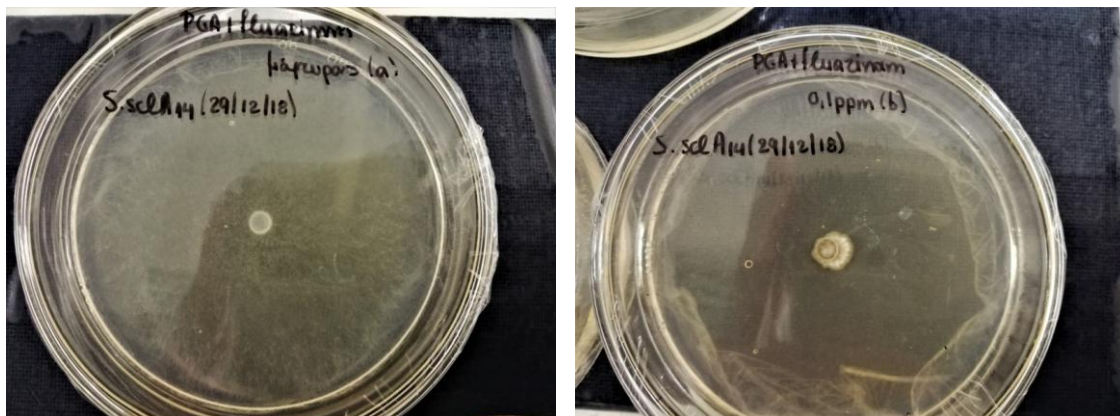
Εικόνα 14 : Ανάπτυξη μυκηλίου *S. sclerotiorum* σε τριβλία Petri 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PGA και 0(αριστερά) και 10 (δεξιά) ppm

3.1.4. Fluazinam

Για τη δραστική ουσία fluazinam η MIC βρέθηκε ίση με 0,1 ppm, ενώ η EC50 υπολογίστηκε ότι είναι μικρότερη του 0,001 ppm. Από τη στατιστική ανάλυση και όπως φαίνεται και από το παρακάτω γράφημα η αποτελεσματικότητα της δραστικής ουσίας δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των 9 απομονώσεων.



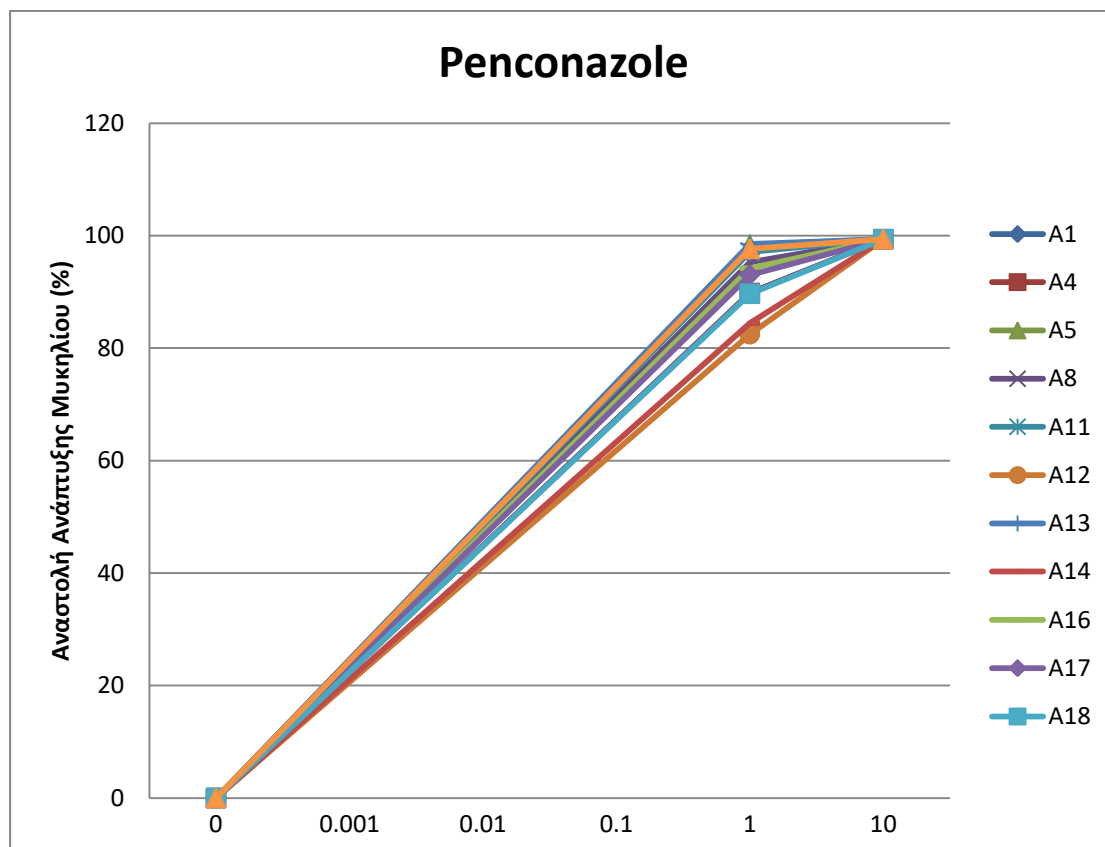
Γράφημα 4: Αναστολή ανάπτυξης μυκηλίου των απομονώσεων *S. sclerotiorum* στις συγκεντρώσεις 0 – 0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 -10 ppm fluazinam σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PGA.



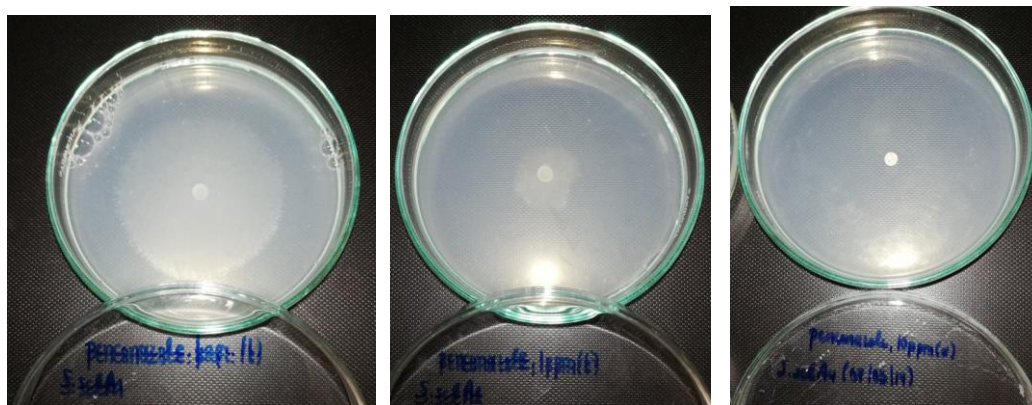
Εικόνες 15: Ανάπτυξη μυκηλίου *S. sclerotiorum* σε τρυβλία Petri 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PGA και 0(αριστερά) και 0,1 (δεξιά) ppm

3.1.5. Penconazole

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τη δραστική ουσία penconazole δείχνουν ότι η αποτελεσματικότητα της ουσίας δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των 11 απομονώσεων. Η MIC βρέθηκε ίση με 10 ppm, ενώ η EC50 υπολογίστηκε στατιστικώς ίση με 0,427 ppm.



Γράφημα 5: Αναστολή ανάπτυξης μυκηλίου των απομονώσεων *S. sclerotiorum* στις συγκεντρώσεις 0 – 0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 – 10 ppm penconazole σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PGA

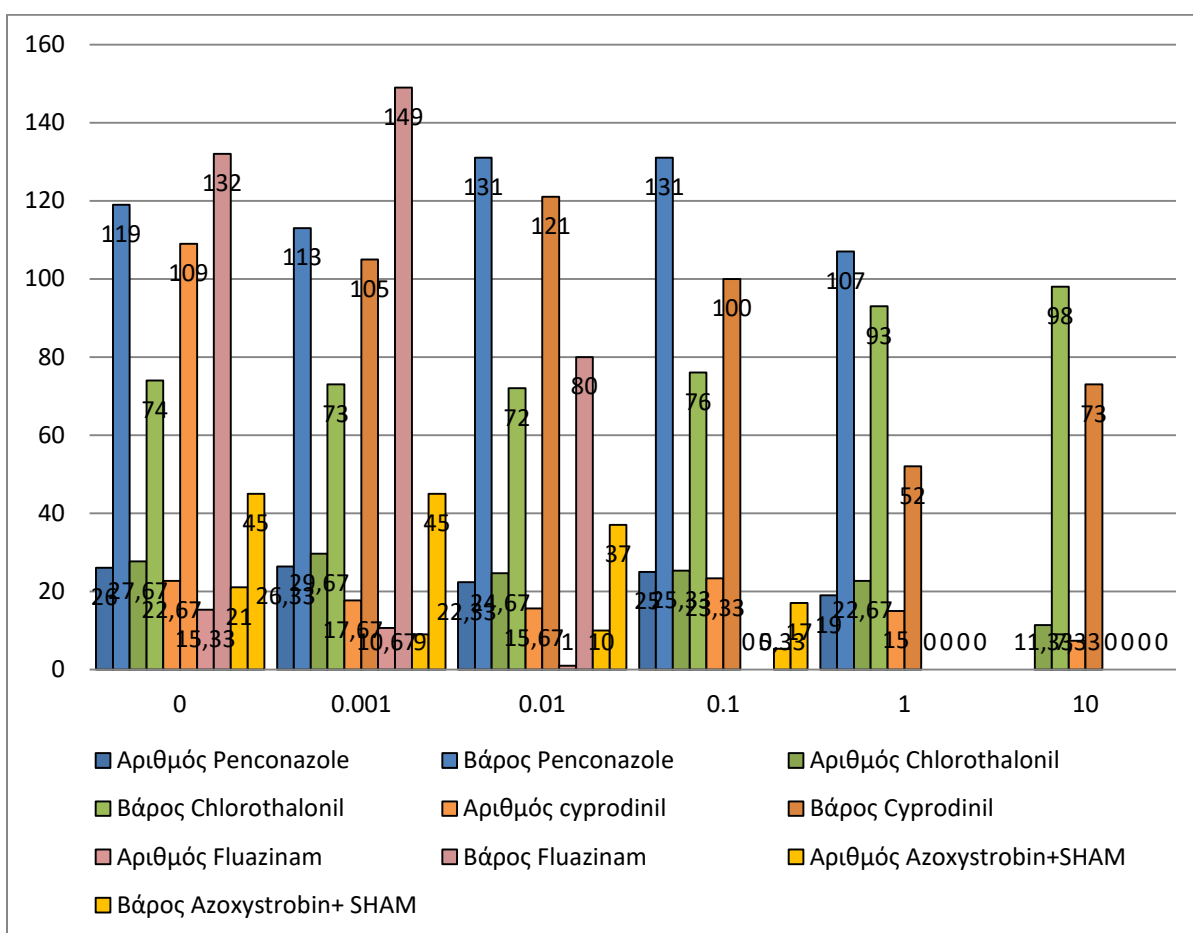


Εικόνες 16: Ανάπτυξη μυκηλίου *S. sclerotiorum* σε τριβλία Petri 9 cm με θρεπτικό υπόστρωμα PGA και 0(αριστερά), 1 (κέντρο) και 10 (δεξιά) ppm

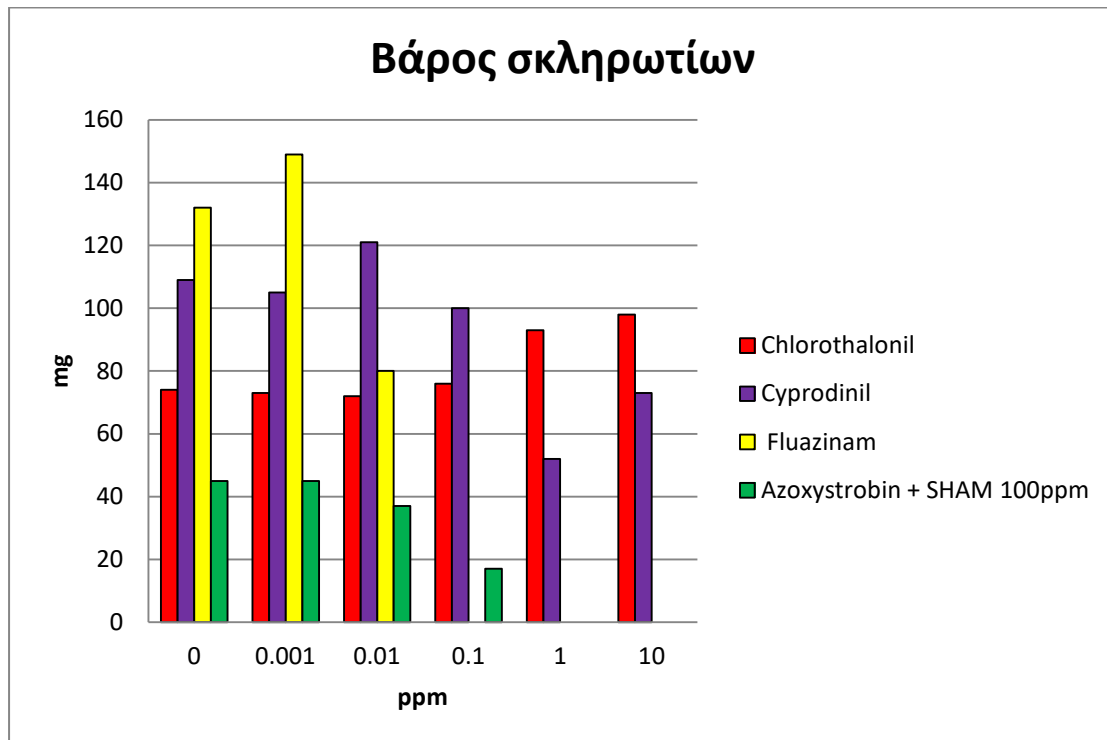
3.2. Αριθμός και βάρος σκληρωτίων ανά μυκητοκτόνο

Για την απομόνωση MS1 έγινε και υπολογισμός του ξηρού βάρους των σκληρωτίων που είχαν σχηματιστεί έπειτα από 10 ημέρες επώασης. Παρακάτω ακολουθεί γραφήμα με σύγκριση του αριθμού των σκληρωτίων σε σχέση με το συνολικό τους βάρος, ανά δοκιμή μυκητοκτόνου σε όλες τις συγκεντρώσεις.

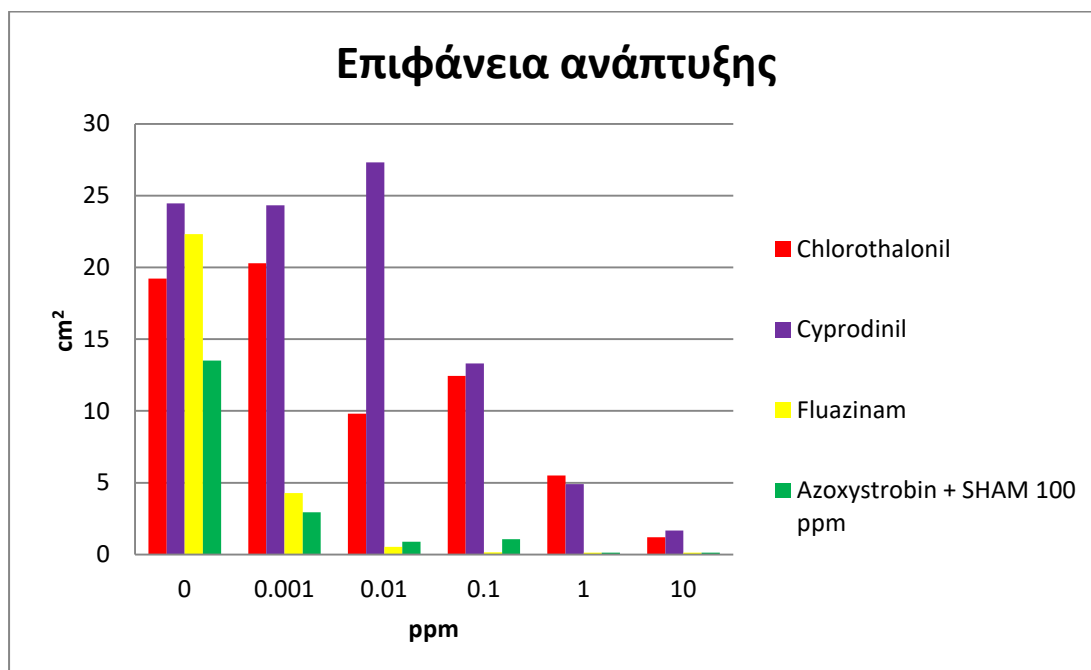
Όπως φαίνεται καλύτερα στο γράφημα 7 το συνολικό βάρος των σχηματιζόμενων σκληρωτίων είτε παραμένει σχεδόν σταθερό, είτε αυξάνεται, παρουσία συγκέντρωσης κάποιων δραστικών ουσιών. Αντίστοιχα για τον αριθμό σκληρωτίων που αντιστοιχούν σε κάθε cm² επιφάνειας, προκύπτει ότι ο αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση των δραστικών ουσιών που εξετάστηκαν, όπως φαίνεται στο γράφημα 9.



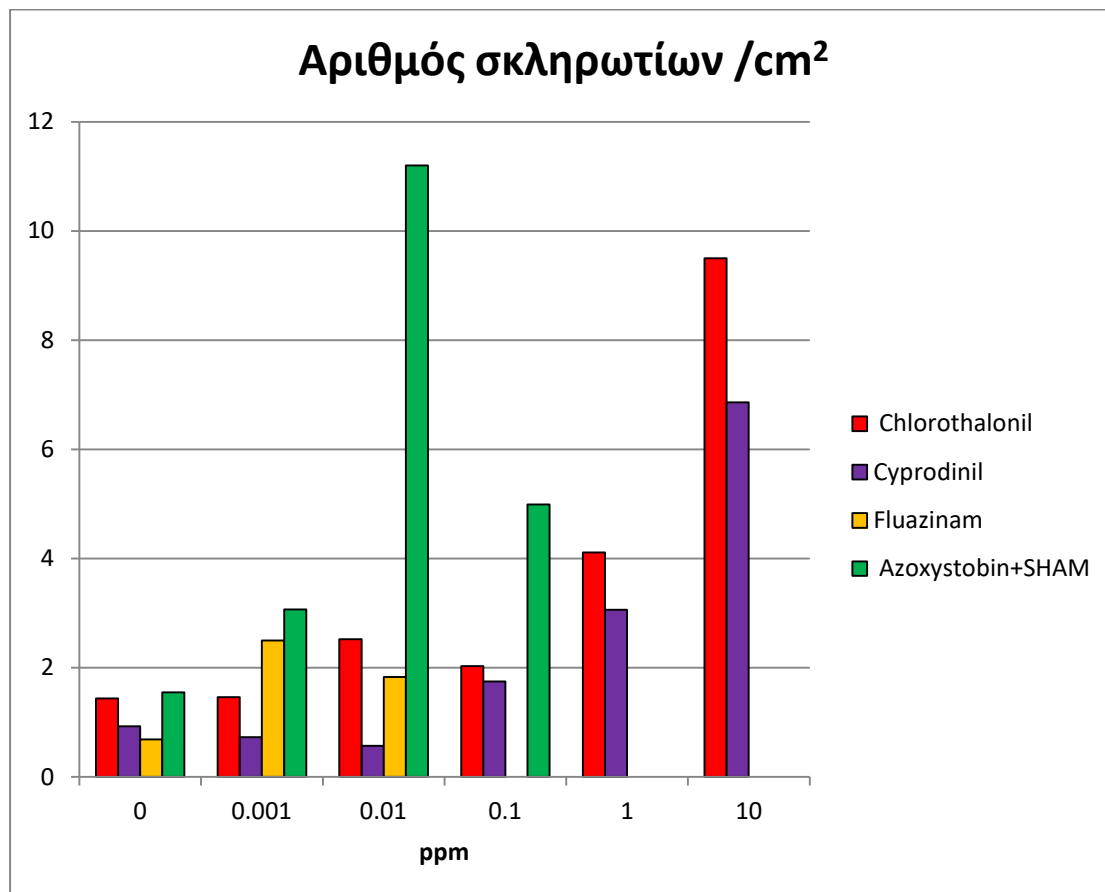
Γράφημα 6: Αριθμός και βάρος σκληρωτίων που σχηματίστηκαν σε όλες τις δραστικές ουσίες και όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν.



Γράφημα 7 : Συνολικό βάρος σκληρωτίων της απομόνωσης MS1 για τις δραστικές ουσίες chlorothalonil, cyprodinil, fluazinam, azoxystrobin+SHAM 100 ppm



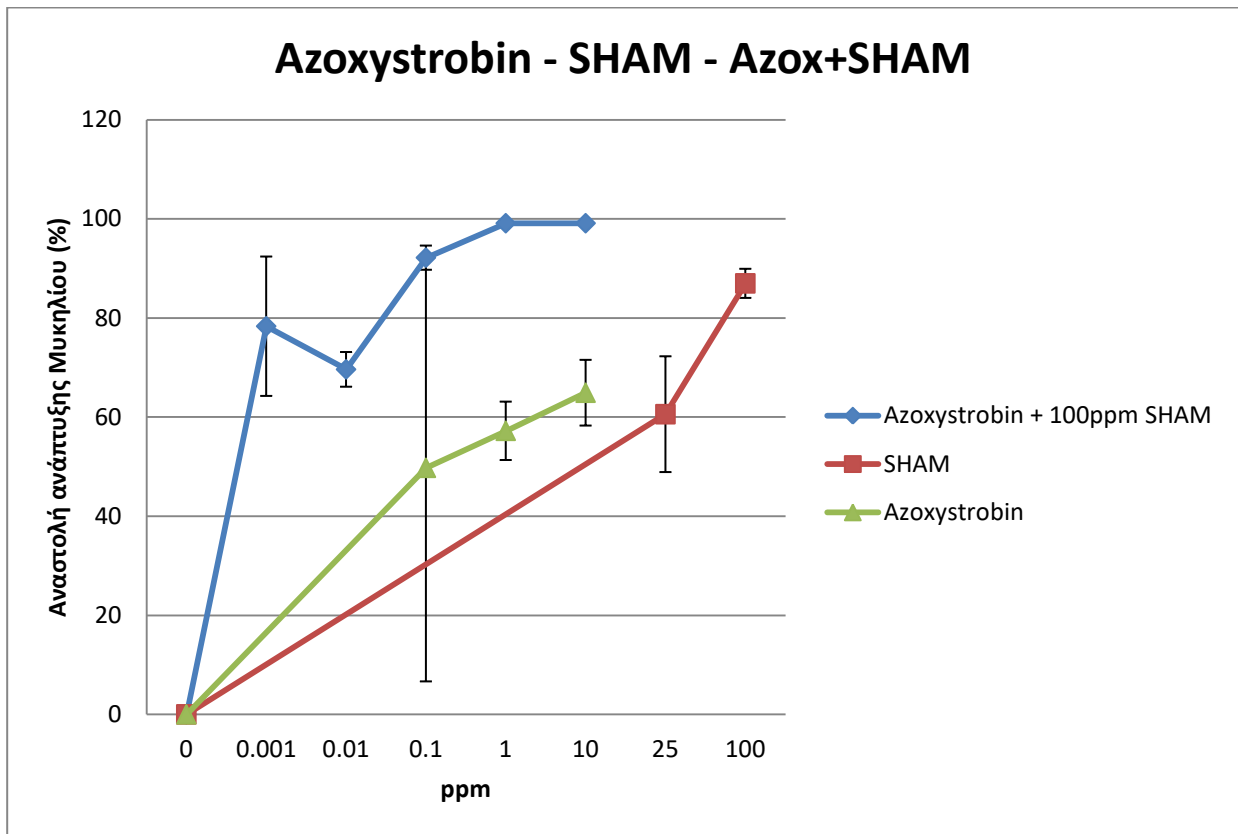
Γράφημα 8: Επιφάνεια ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης MS1 για τις δραστικές ουσίες chlorothalonil, cyprodinil, fluazinam και azoxystrobin + SHAM 100ppm



Γράφημα 9: Αριθμός σκληρωτίων ανά μονάδα επιφάνειας του αναπτυσσόμενου μυκηλίου της απομόνωσης MS1 για τις δραστικές ουσίες chlorothalonil, cyprodinil, fluazinam και azoxystrobin+SHAM 100 ppm

3.3. Συγκριτική απεικόνιση αποτελεσματικότητας azoxystrobin, azoxystrobin + 100 ppm SHAM και SHAM

Για την απομόνωση MS1 έγιναν πειραματικές δοκιμές στις οποίες δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητα που είχε από μόνη της η δραστική ουσία azoxystrobin και η χημική ουσία SHAM. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα το azoxystrobin από μόνο του δεν είναι τόσο αποτελεσματικό όσο όταν δρα μαζί με τη SHAM, αφού 10 ppm azoxystrobin επαρκούν μόλις για να αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου κατά 70%. Στο ίδιο γράφημα φαίνεται ακόμα ότι συγκέντρωση SHAM μπορεί να είναι αποτελεσματική έναντι της ανάπτυξης μυκηλίου.



Γράφημα 10: Συγκριτική απεικόνιση ποσοστού αναστολής ανάπτυξης μεταξύ azoxystrobin, SHAM και της συνδυαστικής τους δράσης

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σκληρωτινίαση αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ασθένειες των κηπευτικών καλλιεργειών παγκοσμίως. Οι καλλιέργειες αυτές αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της καθημερινής διατροφής των ανθρώπων, καθιστώντας έτσι επιτακτική ανάγκη τη συνεχή αναζήτηση νέων τρόπων αντιμετώπισης της συγκεκριμένης ασθένειας. Ενδεικτικά από το 1837 μέχρι και το 2014 είχαν γίνει 1389 επιστημονικές μελέτες σχετικά με την αντιμετώπιση της σκληρωτινίασης, με τον αριθμό αυτόν να αυξάνεται ραγδαία, αφού το 47% των δημοσιεύσεων πραγματοποιήθηκαν μόλις την πρώτη δεκαετία του 21^{ου} αιώνα (Sharma et al., 2015).

Στην παρούσα μελέτη, ο μύκητας *S. sclerotiorum* απομονώθηκε μετά από επώαση των σκληρωτίων που συλλέχτηκαν από τους προσβεβλημένους ιστούς των δειγμάτων. Η γεωγραφική ποικιλομορφία των απομονώσεων ήταν πολύ περιορισμένη διότι οι απομονώσεις του μύκητα προέκυψαν από δειγματοληψία 2 διαφορετικών περιοχών των νομών Λαρίσης και Μαγνησίας.

Εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα 5 μυκητοκτόνων, 5 διαφορετικών ομάδων μυκητοκτόνων με τις δραστικές ουσίες azoxystrobin, chlorothalonil, cyprodinil, fluazinam, penconazole και σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις (10 – 1 – 0,1 – 0,01 – 0,001 – 0 ppm) για την αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου του μύκητα *S. sclerotiorum*. Κύριο κριτήριο επιλογής των μυκητοκτόνων ήταν οι διαφορετικές ομάδες στις οποίες ανήκουν οι δραστικές ουσίες. Κατά τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων, πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός του θρεπτικού υποστρώματος PGA με συγκεκριμένη ποσότητα σκευάσματος, για να εξετασθεί η ανάπτυξη του μυκηλίου στις πρώτες 40 ώρες.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί ποικίλες μελέτες σχετικές με τον έλεγχο της ευαισθησίας του μύκητα *S. sclerotiorum* ως προς την αναστολή ανάπτυξης μυκηλίου. Συγκεκριμένα για τις φαινυλοπυριδινάμινες και το fluazinam στο παρελθόν, μελέτη σχετικά με τη μυκηλιακή ανάπτυξη είχε δείξει 78% μείωση της ανάπτυξης στο 0,01ppm συγκέντρωσης δραστικής ουσίας, 95-99% στο 0,1 ppm και μέχρι και 100% αναστολή στο 1ppm. Επίσης στην ίδια εργασία, μέρος της οποίας εκτυλίχτηκε και στο έδαφος, παρατηρήθηκε μείωση της βλάστησης των σκληρωτίων στις ίδιες συγκεντρώσεις (Matheron, 1993). Στην παρούσα διατριβή το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης του μυκηλίου ήταν ακόμα μεγαλύτερο για το 0,01ppm (85%), ενώ πάνω από 50% μείωση της ανάπτυξης υπήρχε σε 10 φορές μικρότερη συγκέντρωση της δ.ο. (0,001 ppm). Ακόμη σημαντική ήταν και η αναστολή σχηματισμού των σκληρωτίων, όπου στο 0,01 ppm δε σχηματίστηκε

κανένα σκληρώτιο μετά την πάροδο 10 ημερών. Χρήσιμη θα ήταν η περαιτέρω διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του fluazinam στην αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από το φυτοπαθογόνο μύκητα *S. sclerotiorum* καθώς απ όσα μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ήταν αυτό με τη μικρότερη EC50 ($EC_{50} < 0,001$ ppm), και επίσης για το λόγο ότι κανένα μυκητοκτόνο από την ομάδα των φαινυλοπυριδινωδών δεν είναι εγκεκριμένο από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για το είδος των καλλιεργειών απ όπου προήλθαν οι απομονώσεις (αγγούρι θερμοκηπίου και υπαίθρια κολοκύθια).

Επιπλέον, εργασία που έγινε σχετικά με την αποτελεσματικότητα σκευασμάτων στην αναστολή ανάπτυξης μυκηλίου απομονώσεων του μύκητα *S. sclerotiorum* από φυτά *Cichorium intybus* L. βρέθηκε ότι σε σκεύασμα, που περιέχει μείγμα των δραστικών ουσιών fludioxonil και cyprodinil, σε τελικές συγκεντρώσεις 225 ppm και 340 ppm αντίστοιχα στο θρεπτικό υπόστρωμα (PGA) προκλήθηκε 52% αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου στους 20 °C , ενώ στους 16 °C η αναστολή έφτασε και το 84% (Benigni & Bompreix, 2010). Στην παρούσα εργασία όμως προέκυψε ότι ακόμα και 0,096 ppm είναι αρκετά για να αναστείλουν την ανάπτυξη του μυκηλίου κατά 50% στους 25°C ($EC_{50}=0,096$), ποσότητα δηλαδή σημαντικά λιγότερη απ' ότι στο προηγούμενο πείραμα.

Όσον αφορά το penconazole στην παρούσα εργασία προέκυψε ότι η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) είναι 10 ppm και η μέση αποτελεσματική συγκέντρωση (EC_{50}) ίση με 0,427 ppm. Συγκριτικά με παλαιότερη έρευνα προέκυψε ότι πιθανότατα να έχει αναπτυχθεί σταδιακά ανθεκτικότητα του μύκητα στη συγκεκριμένη δραστική ουσία, μιας και τα αποτελέσματα τότε είχαν δείξει ότι η EC_{50} ήταν κοντά στο 0,1 ppm (Bairwa et al.,2017). Αντίστοιχο συμπέρασμα μπορεί να προκύψει και από τη σύγκριση του αριθμού των παραγόμενων σκληρωτίων σε συγκέντρωση 0,1 ppm, όπου στη βιβλιογραφία ο μέσος όρος ήταν μόλις 6,33 , ενώ στην παρούσα διατριβή είναι 25 σκληρώτια.

Όσον αφορά το chlorothalonil στην παρούσα εργασία δεν προσδιορίστηκε η ελάχιστη παραμποδιστική συγκέντρωση, αφού ήταν μεγαλύτερη των 10 ppm που δοκιμάστηκαν. Η EC_{50} όμως υπολογίστηκε ίση με 0,334 ppm, η οποία συγκριτικά με παλαιότερη έρευνα είναι πολύ μικρότερη, αφού σε δημοσίευση του 2012 αναφέροταν ότι 50% αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου υπήρχε στα 2000 ppm δ.ο. (Singh et al. 2014)

Σχετικά με τη δράση των στρομπιλουρινών και ειδικά του azoxystrobin έχουν γίνει ποικίλες μελέτες στο παρελθόν. Ενδεικτικά από μια δημοσίευση του 2012 προέκυπτε ότι 0,1127-0,6163 ppm ήταν αρκετά για να μειώσουν την ανάπτυξη του μυκηλίου κατά 50% (Duan et al., 2012). Στην παρούσα εργασία όμως η αντίστοιχη συγκέντρωση ήταν αρκετά μικρότερη, με $EC_{50} = 0,006$ όταν το azoxystrobin δρούσε μόνο του και $EC_{50} < 0,001$ όταν βρισκόταν σε συνδυαστική δράση με τη SHAM. Αναφορικά με τη SHAM στην παρούσα διατριβή η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε μαζί με τις διάφορες συγκεντρώσεις azoxystrobin ήταν πάντα 100 ppm, ενώ στη βιβλιογραφία δεν προσδιορίζεται ακριβώς η συγκέντρωση της ουσίας, αναφέροντας μόνο ότι όσο αυξανόταν η ποσότητά της, τόσο αυξανόταν και η αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου.

Ακόμη, από την προηγούμενη εργασία είχε προκύψει ότι τα ποσοστά αναστολής ανάπτυξης του μυκηλίου διέφεραν αισθητά μεταξύ τους στις 12 ώρες και στις 24 ώρες επώασης, με τη μεγαλύτερη αναστολή να παρατηρείται μετά από 24 ώρες επώαση. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δε μπορούν να συγκριθούν με την προαναφερθείσα εργασία, διότι οι μετρήσεις έγιναν μόνο μία φορά στις 40 περίπου ώρες επώασης στους 25°C. Τέλος, σε παρόμοια έρευνα με μελέτη της δράσης μιας άλλης στρομπιλουρίνης, του pyroclostrobin, αποδείχτηκε ότι ακόμα και 20 ppm SHAM ήταν αρκετά για να ενισχύσουν στατιστικώς σημαντικά τη δράση της ουσίας, έχοντας $EC_{50} = 0,0173$ ppm έναντι $EC_{50} = 0,0587$ που ήταν χωρίς παρουσία SHAM (Liang et al., 2015). Και σε αυτή την περίπτωση τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της δ.ο., ενισχύοντας το ενδιαφέρον για περαιτέρω διερεύνηση.

Ως προς τη δράση που έχει η SHAM από μόνη της έναντι της αναστολής της ανάπτυξης του μυκηλίου είναι έκδηλο ότι χρειάζεται περαιτέρω έρευνα σε ότι αφορά τις συγκεντρώσεις που πρέπει να προστίθενται στις δοκιμές αποτελεσματικότητας των στρομπιλουρινών. Ενδεικτικά σε παλαιότερη μελέτη είχε προκύψει ότι στα 20 ppm SHAM υπάρχει μικρή αναστολή στην ανάπτυξη του μυκηλίου, ενώ τα 40 ppm προκαλούσαν αισθητή μείωση, με το EC_{50} να κυμαίνεται από 44,4 έως 68,68 ppm (Liang et al., 2015). Στο παρών πείραμα το EC_{50} που προέκυψε ήταν 20,7 ppm, σχεδόν η μισή συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι μόνο ενδεικτικά διότι χρησιμοποιήθηκε μόνο μία απομόνωση του μύκητα και μόνο δύο συγκεντρώσεις SHAM. Επομένως, στο μέλλον θα άξιζε πιθανόν να γίνουν επιπλέον δοκιμές και αποτελεί εύλογο ερώτημα γιατί οι εταιρίες δεν το έχουν κάνει ακόμα.

Σχετικά με το βάρος και τον αριθμό των σκληρωτίων τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν αντιφατικά και δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο επηρεάζεται η δημιουργία τους από τη στιγμή που έχει δημιουργηθεί μυκήλιο. Ειδικότερα παρατηρήθηκε πως ακόμα και αν το μυκήλιο που αναπτυσσόταν στις πρώτες 48 ώρες ήταν μικρής επιφάνειας, μετά από 10 ημερες σε όλες σχεδόν τις δοκιμές, σκληρώτια σχηματίζονταν, είτε κοντά στο αρχικό κομμάτι μυκηλίου, είτε στην περιφέρεια του νεοδημιουργηθέντος μυκηλίου.

Επιπροσθέτως, στην πρώτη δοκιμή με το penconazole, μετά τη συλλογή των σκληρωτίων στις 10 ημέρες, τα τριβλία αφέθηκαν στον επωαστικό μέχρι να συμπληρώσουν 4 εβδομάδες από την ημέρα της δοκιμής. Τότε παρατηρήθηκε πως δημιουργήθηκαν επιπλέον σκληρώτια σε όλες τις συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας, δημιουργώντας το ερώτημα για πόσο χρονικό διάστημα το περιβάλλον παραμένει τοξικό μετά την εφαρμογή του σκευάσματος.

Σε αρκετά τριβλία παρατηρήθηκαν διαφορές στη μορφολογία του μυκηλίου της ίδιας απομόνωσης, όταν αυτό είχε αναπτυχθεί σε τοξικό περιβάλλον σε σχέση με το μυκήλιο της απομόνωσης που αναπτύχθηκε απουσία μυκητοκτόνου, δίνοντας έτσι αφορμή για περαιτέρω παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Στα δείγματα που παρατηρήθηκαν φάνηκε ξεκάθαρα η νέκρωση κάποιων μερών του μυκηλίου, δεν είμαστε σίγουροι όμως ότι υπήρχαν σαφείς διαφορές .

Γενικότερα, η εικόνα που έδωσαν τα συγκεκριμένα μυκητοκτόνα ήταν ενθαρρυντική και θα μπορούσαν να βρουν πρακτική εφαρμογή οι συγκεκριμένες δραστικές ουσίες (azoxystrobin, chlorothalonil, cyprodinil, fluazinam και penconazole) στην αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούνται από τον μύκητα *S. sclerotiorum*. Πρώτα όμως θα πρέπει να εξεταστεί η υπολειμματικότητα που έχουν τα μυκητοκτόνα αυτά στο έδαφος και στις καλλιέργειες. Για παράδειγμα, για το fluazinam δεν έχει προσδιορισθεί ακόμα ακριβώς η συκέντρωση της δ.ο. που παραμένει στο έδαφος μετά την εφαρμογή, το σίγουρο όμως είναι ότι έχει αθροιστική υπολειμματικότητα, συσσωρεύοντας έτσι ποσότητες στο έδαφος μετά από συνεχόμενη δράση για 2 χρόνια (Dong et al., 2008). Επιπλέον, για το chlorothalonil, έρευνα αναφέρει ότι προκαλεί χρόνια τοξικότητα και μπορεί να αποβεί θανατηφόρο για τις λάρβες των μελλισών, ειδικά εκείνες των τεσσάρων ημερών (Zhu et al., 2014).

Αντίστοιχα και για τις υπόλοιπες δραστικές ουσίες μπορεί να υπάρχουν παρόμοιες μελέτες ως προς την υπολειμματικότητά τους στο έδαφος, το νερό, τους φυτικούς ή

ζωικούς οργανισμούς και μικροοργανισμούς. Συμπερασματικά, παρότι οι περισσότερες από τις ουσίες αυτές (azoxystrobin, chlorothalonil, penconazole, cyprodinil) είναι εγκεκριμένες για τις δύο καλλιέργειες από τις οποίες έγινε η δειγματοληψία, θα πρέπει να γίνει προσεκτικός πειραματικός έλεγχος για να προσδιοριστούν οι κατάλληλες συνιστώμενες δόσεις.

Τέλος, χρήσιμη για το περιβάλλον πρωτίστως θα ήταν η στροφή σε εναλλακτικές βιολογικές μορφές αντιμετώπισης της ασθένειας π.χ. μυκοπαράσιτα ή φυτικά εκχυλίσματα, ώστε να μειωθεί η μέχρι τώρα συνεχής επιβάρυνσή του.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως προέκυψε έπειτα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα παρακάτω:

1. Ανάμεσα στα fluazinam, azoxystrobin και penconazole πιο αποτελεσματικό ήταν το fluazinam με MIC = 0,1 ppm, ακολουθεί το azoxystrobin (παρουσία 100ppm SHAM) με MIC = 1 ppm και τέλος το penconazole με MIC = 10 ppm. Αντίστοιχα οι EC50 τους ήταν για το fluazinam και το azoxystrobin μικρότερη από 0,001 ppm, ενώ για το penconazole ίση με 0,427 ppm
2. Για το chlorothalonil και το cyprodinil δεν προσδιορίστηκε η MIC, παρά μόνο η EC50 που ήταν 0,334ppm και 0,096ppm αντίστοιχα.
3. Η χημική ουσία SHAM παρουσιάζει αναστολή της αύξησης του μυκηλίου, με την EC50 να υπολογίζεται στα 20,7 ppm.
4. Το azoxystrobin από μόνο του δεν ήταν τόσο αποτελεσματικό όσο σε συνδυασμό με 100 ppm SHAM, αφού ακόμα και 10 ppm δ.ο. δεν επαρκούν για να αναστείλουν πλήρως την ανάπτυξη του μυκηλίου. Η EC50 όμως υπολογίζεται ίση με 0,006ppm.
5. Ο αριθμός των σκληρωτίων επηρεάζεται άμεσα από την παρουσία μυκητοκτόνου, δίνοντας μεγαλύτερο αριθμό σκληρωτίων ανά cm² επιφάνειας στις δοκιμές που παρουσία δ.ο. σε σχέση με το μάρτυρα.
6. Από τη στιγμή που θα σχηματιστούν τα σκληρώτια το συνολικό βάρος του αριθμού τους φαίνεται να παραμένει σταθερό ή ακόμα και να είναι αυξημένο στις δοκιμές με δ.ο. σε σχέση με του μάρτυρα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1) Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ζιώγας, Β., Μάρκογλου, Α. (2017). Γεωργική Φαρμακολογία, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. Γ' Έκδοση. Εκδόσεις Greenbooks publications, Αθήνα
- Πλαισιο, Α. Ν. (2014). Υπουργείο αγροτικής ανάπτυξης και τροφίμων, 1–65.
- Τζάμος, Ε. (2007). Φυτοπαθολογία. Β' Έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2019). Κατάλογος Δραστικών Ουσιών κατά Καλλιέργεια. <http://www.minagric.gr> .(Πρόσβαση στις 12/06/2019)
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2019). Οδηγίες Ολοκληρωμένες Φυτοπροστασίες. <http://www.minagric.gr> .(Πρόσβαση στις 01/06/2019)
- Χατζηδημόπουλος, Μ. (2014). Επιδημιολογία και αντιμετώπιση του βοτρυτή σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ν. Ιωνία Μαγνησίας.

6.2) Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Abawi, G. S. (1975). Source of Primary Inoculum and Effects of Temperature and Moisture on Infection of Beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 65(3), 300. <https://doi.org/10.1094/Phyto-65-300>
- Abawi, G. S. and Grogan, R. G. (1979). Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *The American Phytopathology Society*, 69 (8), 899-904.
- Agrios G. (2005). *Plant Pathology*. 5th Edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 546-550
- Anon 2019a-f, PubChem, U.S. National Library of Medicine (2019). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Πρόσβαση στις 16/12/2018)
- Anon. (2019) www.definitions.net (Πρόσβαση στις 4/7/2019)
- Bairwa, S. K., Godara, S. L., & Meena, S. (2017). In Vitro Efficacy of Fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their Potential for Control of Stem Rot in Indian Mustard (*Brassica juncea* L.) . *International Journal of Bio-Resource and Stress Management*, 6(4), 497. <https://doi.org/10.5958/0976-4038.2015.00073.1>
- Bardin, S. D., & Huang, H. C. (2001). Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada 1. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23(1), 88–98. <https://doi.org/10.1080/07060660109506914>
- Ben- Yephet, Y., Gezini, A. and Siti, E. (1993). Sclerotial survival and Apothecial

Production by *Sclerotinia sclerotiorum* Following Outbreaks of Lettuce Drop. The American Phthopathology Society, 83 (5), 509-513.

- Benigni, M., & Bompeix, G. (2010). Chemical and biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in witloof chicory culture. *Pest Management Science*, 66(12), 1332–1336. <https://doi.org/10.1002/ps.2019>
- Cox, C. (1997). Fungicide Factsheet: Chlorothalonil. *Journal of Pesticide Reform*, 17(4), 14–20.
- Dr. Gerd Stammler (2008). *Sclerotinia sclerotiorum*. In : Fungicide Resistance Action Committee <https://doi.org/10.16423/j.cnki.1003-8701.2008.04.005>
- Dr. Helge Sierotzki. (2006). FRAC Protocols for sensitivity of *Alternaria solani* to QoI fungicides.
- Duan, Y., Liu, S., Ge, C., Feng, X., Chen, C., & Zhou, M. (2012). In vitro inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* by mixtures of azoxystrobin, SHAM, and thiram. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(2), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.04.004>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (2019)
- Fernando, W. G. D., Nakkeeran, S., Zhang, Y., & Savchuk, S. (2007). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*, 26(2), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.04.007>
- Gerlagh, M., Goossen-van de Geijn, H. M., Fokkema, N. J., & Vereijken, P. F. G. (1999). Long-Term Biosanitation by Application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum* -Infected Crops. *Phytopathology*, 89(2), 141–147. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.2.141>
- International Union of Pure and Applied Chemistry, 2019 <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/199.htm>. Πρόσβαση στις 15/06/2019).
- Ishihara Sangyo Kaisha, LTD, 1990. <http://www.iskweb.co.jp> (Πρόσβαση στις 17/12/2018)
- Jeffries, P. R. (2005). Development and testing of a Hyperlearning Model for design of an online critical care course. *The Journal of Nursing Education*, 44(8), 366–372. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16130343>
- Kapatia, A., Gupta, T., Sharma, M., Khan, A., & Kulshrestha, S. (2016). Isolation and analysis of genetic diversity amongst *Sclerotinia sclerotiorum* isolates infecting cauliflower and pea. *Indian Journal of Biotechnology*, 15(4), 589–595.

- Kehl H. (1982). Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids. 1st International Symposium, Dayton, Ohio, 1982
- Liang, H.-J., Di, Y.-L., Li, J.-L., You, H., & Zhu, F.-X. (2015). Baseline Sensitivity of Pyraclostrobin and Toxicity of SHAM to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease, 99(2), 267–273. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0633-RE>
- Lichens-park, R. A. D. A. (2014). Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens. (R. A. Dean, A. Lichens-Park, & C. Kole, Eds.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-44056-8>
- Mahalingam, T., Guruge, B. M. A., Somachandra, K. P., Rajapakse, C. S., & Attanayake, R. N. (2017). First Report of White Mold Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on Cabbage in Sri Lanka. Plant Disease, 101(1), 249–249. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0693-PDN>
- Matheron, M. E. (1993). Effect of Sodium Tetrathiocarbonate on Growth and Viability of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and Development of Lettuce Drop. Plant Disease, 77(10), 995. <https://doi.org/10.1094/PD-77-0995>
- Mirza, S., & Ahmad, Y. (1988). Cabbage : a new host of *Sclerotinia sclerotiorum* for Pakistan. Agronomie, 8(1), 85–87. <https://doi.org/10.1051/agro:19880111>
- Nelson, B. (1998). Biology of *Sclerotinia*. In: Proceedings of the 10th International *Sclerotinia* workshop, 21 Jan. 1998, Fargo, ND, USA. North Dakota State University Department of Plant Pathology, Fargo, ND, pp. 1–5
- Pesticide Properties BataBase (2007). <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/> (Πρόσβαση στις 16/12/2018).
- Purdy, L. H. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. Phytopathology, 69(8), 875. <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-875>
- Sabaté, D. C., Brandan, C. P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2018). Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. Microbiological Research, 211(October 2017), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.003>
- Saharan G. S. and Dr. Naresh Mehta (2008). *Sclerotinia* diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. Springer, London

- Sharma, P., Meena, P. D., Verma, P. R., Saharan, G. S., Mehta, N., Singh, D., & Kumar, A. (2015). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causing Sclerotinia rot in oilseed Brassicas: A review. *Journal of Oilseed Brassica*, 6(January), 1–44.
- Singh N. K, Singh R. B. and Singh V. (2014). Efficacy of fungicides and bio-pesticide against the *Sclerotinia sclerotiorum* causing Sclerotinia rot of Mustard. *IORS Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 7(5), pp. 20-23
- Sun, P., & Yang, X. B. (2000). Light, Temperature, and Moisture Effects on Apothecium Production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 84(12), 1287–1293. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.12.1287>
- Technology, A., & Academy, C. (2008). *Agricultural Sciences in China 2008 Feng-shou DONG.pdf*, 7(2), 193–199.
- Wan, G. K., Weon, D. C., Hyeong, J. J. (1999). Occurrence of Sclerotinia Rot on Cucurbitaceous Vegetable Crops in Greenhouses. *The Korean Journal of Mycology*, 27(3), 198-205
- Wood P.M. and Hollomon D. W. (2003). A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest Management Science*. 59(5), pp. 499-511
- Zhu, W., Schmehl, D. R., Mullin, C. A., & Frazier, J. L. (2014). Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077547>